ANTON CIUCU

BIOCHIMIE ANALITICĂ

Partea I

Editura Universității din București
2000

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOTECA CENTRALA
UNIVERSITARA
Bucureşti

Cota IV 516638
Inventar C2002117

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ANTON CIUCU

BIOCHIMIE ANALITICĂ
Partea I

Editura Universităţii din Bucureşti
2000

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ
BUCUREŞTI
COTA IV 506638

Referenţi ştiinţifici: Prof. dr. ***George Emil BAIULESCU***
Prof. dr. ***Vasile MAGEARU***

© Editura Universităţii din Bucureşti
Şos. Panduri, 90-92, Bucureşti - 76235; Telefon 410.23.84

B.C.U. Bucureşti
C20002117

Tiparul s-a executat sub. cda 657/1999
la Tipografia Editurii Universităţii din Bucureşti

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale
CIUCU, ANTON
Biochimie Analitică / Anton Ciucu - Bucureşti: Editura Universităţii din Bucureçti, 2000
p.: 28 cm
Bibliogr.
ISBN: 973-575-415-0

577.1

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CUPRINS

1. NOȚIUNI GENERALE DESPRE ENZIME 7

1.1. Terminologie 7
1.2. Nomenclatura şi clasificarea enzimelor 12
1.3. Enzime ca reactivi analitici 15
1.4. Metode de imobilizare a enzimelor 17
1.4.1. Adsorbţie 19
1.4.2. Legarea covalentă 19
1.4.3. Entrapare 20
1.4.4. Legarea încrucişată 20
1.4.5. Electropolimerizare 21
1.5. Aplicaţiile enzimelor în chimia analitică 21
1.5.1. Reactoare analitice enzimatice 22
1.5.2. Aplicaţiile enzimelor în controlul calităţii alimentelor 23
1.5.3. Aplicaţiile enzimelor în laboratorul clinic 25
1.5.4. Aplicaţiile enzimelor în controlul poluării mediului 27

2. ELEMENTE DE CINETICĂ ENZIMATICĂ 30

2.1. Ecuaţia Michaelis-Menten 31
2.2. Semnificaţia cinetică şi analitică a parametrilor K_m şi V_{max} 35
2.3. Natura hiperbolică a ecuaţiei Michaelis-Menten 37
2.4. Reprezentări grafice ale ecuaţiei Michaelis-Menten. Determinarea parametrilor cinetici K_m şi V_{max}. 38
2.4.1. Metoda vitezei iniţiale 38
2.4.2. Metoda vitezei integrate 45
2.5. Factori care influenţează cinetica reacţiilor enzimatice 49
2.5.1. Efectul temperaturii 49
2.5.2. Efectul pH-ului 50
2.5.3 Efectul tăriei ionice 51

3. ANALIZA ENZIMATICĂ 52

3.1. Mecanismul enzimatic 54
3.2. Activarea şi inhibarea enzimelor 55
3.3. Alosterie 55
3.4. Izoenzime 56
3.5. Determinări enzimatice 57
3.5.1. Determinarea enzimei 57

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3.5.1.1. Determinarea enzimelor prin analiza cinetică a activităţii catalitice 58
3.5.1.2. Reacţii enzimatice cuplate 63
3.5.1.3. Unităţi enzimatice 66
3.6. Determinarea substratelor 68
3.6.1. Metoda modificării totale (echilibrului) 68
3.6.2. Metoda cinetică 71

4. APLICAŢIILE BIOANALITICE ALE REACŢIILOR ENZIMATICE BAZATE PE INHIBITORI 72

4.1. Inhibiţia în soluţie 73
4.1.1. Inhibiţia reversibilă 74
4.1.1.1. Inhibiţia competitivă 74
4.1.1.2. Inhibiţia necompetitivă 80
4.1.1.3. Inhibiţia non-competitivă 83
4.1.1.4. Inhibiţia mixtă 86
4.1.1.5. Inhibiţia prin substrat 90
4.1.2. Inhibiţia ireversibilă 92
4.2. Inhibiţia enzimelor imobilizate pe supafaţa biosensorilor 94
4.3. Aplicaţii bioanalitice ale reacţiilor de inhibiţie 95
4.3.1. Determinarea pesticidelor organofosforice şi carbamate 96
4.3.2. Determinarea fungicidelor ditiocarbamate 100

5. BIOSENSORI. APLICAŢII BIOANALITICE 103
5.1. Biosensori clasici 105
5.1.1. Principiul de construcţie şi funcţionare al biosensorilor 106
5.1.2. Definiţia biosensorilor 108
5.1.3. Dezvoltarea istorică a conceptului de biosensor 110
5.1.4. Aplicaţiile biosensorilor 111
5.2. Tehnici de imobilizare a biocomponenţilor pe suprafaţa sensorilor 113
5.3. Electrozi enzimatici bazaţi pe traductori electrochimici 115
5.3.1. Electrozi enzimatici potenţiometrici 119
5.3.2. Electrozi enzimatici amperometrici 123

6. APLICAŢIILE REACŢIILOR IMUNOCHIMICE ÎN CHIMIA ANALITICĂ 129

6.1. Introducere 129
6.2. Anticorpi-aspecte generale 130
6.2.1. Structura şi rolul anticorpilor 130
6.2.2. Producerea de anticorpi 132
6.2.2.1. Anticorpi policlonali 132
6.2.2.2. Anticorpi monoclonali 132
6.2.3. Reactivitatea încrucişată (nespecifică) şi modul de lucru cu haptena (antigenul incomplet) 133
6.2.4. Anticorpii - elementele de recunoaştere moleculară 133

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

6.3. Imobilizarea anticorpilor 133
6.3.1. Imobilizarea nedirecţionată realizată prin grupele ε-amino ale anticorpilor 133
6.3.2. Imobilizarea direcţionată prin intermediul unor grupe specifice ale Ac 134
6.4. Interacţia specifică faţă de cea nespecifică 135
6.5. Regenerarea imunosensorilor 135
6.6. Aspecte teoretice ale imunoanalizei 136
6.7. Principiile imunoanalizei 138
6.7.1. Imunoanaliza competitivă 139
6.7.2. Imunoanaliza necompetitivă 139
6.8. Markeri folosiţi pentru obtinerea informaţiei analitice şi biochimia conjugării 140
6.9. Imunodeterminări electrochimice 141
6.10. Imunosensori 142
BIBLIOGRAFIE 144

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1. NOȚIUNI GENERALE DESPRE ENZIME

Domeniul biochimiei analitice este un domeniu vast din cadrul biochimiei şi/sau al chimiei analitice foarte dinamic şi modern, el incluzând metode biochimice de separare şi de identificare a reactanţilor şi a produşilor de reacţie biochimici (electroforeza, ultracentrifugarea, gel-cromatografia, cromatografia de afinitate ş.a.) precum şi metode enzimatice de analiză care au la bază diferite tehnici cum sunt: volumetrice, manometrice, spectrometrice şi electrometrice.

Enzimele sunt molecule proteice care acţionează drept catalizatori ai reacţiilor chimice complexe acestea întreţinând şi reproducând viaţa la temperatura ambiantă, ocupând astfel un loc central în cadrul biochimiei.

Enzimele pot fi izolate din diferite surse animale sau vegetale. În cadrul organismelor animale, surse bogate în enzime sunt pancreasul, ficatul, sângele, mitocondria. Enzimele sunt fie extracelulare, ele fiind deci, eliberate de către celulele vii în mediul lor înconjurător, fie intracelulare, acestea fiind asociate cu membrane sau particule subcelulare. Enzimele extracelulare sunt mai uşor de izolat şi purificat comparativ cu enzimele intracelulare, şi de aceea ele au fost mult mai studiate din punct de vedere al proprietăţilor fizico-chimice. Majoritatea enzimelor de importanţă comercială sunt extracelulare şi sunt obţinute din surse microbiene prin procedee fermentative industriale.

În ultimii ani, cunoştiinţele despre enzime au evoluat de la conceptul de "proteine cu activitate catalitică specifică", la o descriere a macromoleculelor chimice cu o structură, funcţie şi control bine definite.

Până în prezent, în literatura de specialitate s-au descris aproximativ 2000 de enzime diferite, câteva sute dintre acestea fiind purificate şi obţinute într-o stare omogenă, iar dintre ele, 50 au fost caracterizate din punct de vedere al proprietăţilor fizico-chimice.

Enzima, este deci o proteină care posedă atât *specificitate* cât şi *activitate catalitică*.

Există enzime care prezintă numai o componentă proteică şi enzime complexe a căror acţiune specifică se manifestă numai în prezenţa unor substrate speciale (denumite *cofactori*). Acestea din urmă sunt alcătuite dintr-un component termolabil proteic şi unul termostabil neproteic ele fiind denumite *holoenzime* (figura 1.1).

Pentru enzimele care necesită componente neproteice pentru a fi active funcţional, este unanim acceptat faptul că termenul de *holoenzimă* se referă la entitatea catalitică completă care constă dintr-o parte proteică cunoscută sub numele de *apoenzimă* şi un constituent neproteic (*cofactorul*). Dacă se îndepărtează constituentul neproteic (*cofactorul*), componenta proteică nu mai prezintă activitate enzimatică.

1.1. TERMINOLOGIE

Termenii utilizaţi pentru constituenţii neproteici necesari funcţional sunt totuşi ambigui şi diferă de la o lucrare la alta.

Lucrările lui Lehninger [1] descriu *cofactorul* drept un component neproteic asociat enzimei, reprezentând termenul general prin care se desemnează compusul chimic diferit de *apoenzimă* şi care poate fi necesar sau chiar esenţial în manifestarea *activităţii catalitice*. În categoria cofactorilor se includ *coenzimele* şi *ionii metalici esenţiali* (figura 1.1).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

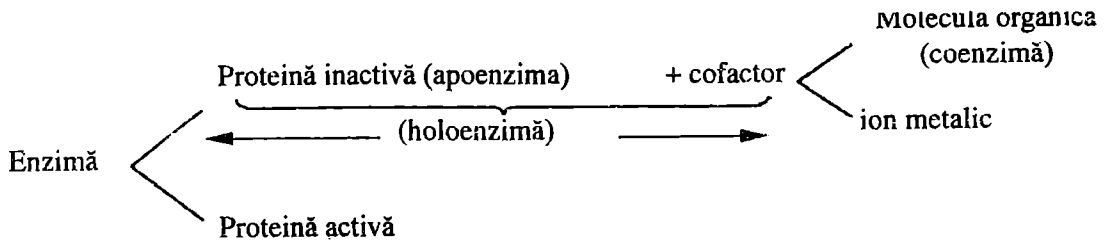


Fig. 1.1. Reprezentarea schematică a componentelor structurale ale enzimelor

Coenzimele sunt substanţe chimice care au proprietatea de a transporta diferite grupări chimice cum ar fi: grupări metabolice, echivalenţi de oxido-reducere ş.a. O *coenzimă* poate fi definită ca fiind un compus organic care prezintă proprietăţi fizico-chimice diferite de cele ale catenei polipeptidice ale enzimei şi care acţionează împreună cu enzima pentru a cataliza reacţia biochimică. Ele sunt compuşi din clasa vitaminelor sau derivaţi ai acestora. *Coenzimele* pot funcţiona drept catalizatori în absenţa proteinelor (enzimelor), dar activitatea *coenzimelor* creşte odată cu legarea lor de macromolecula proteică. Majoritatea *coenzimelor* sunt legate de enzime prin legături necovalente; cele care formează legături covalente cu enzimele sunt denumite uneori *grupări prostetice*, ele fiind parte integrantă a centrului activ al unei enzime, iar în urma reacţiei enzimatice ele rămân nemodificate.

În cadrul reacţiilor enzimatice la care *coenzimele* participă, acestea pot suferii modificări chimice. Regenerarea moleculei poate fi catalizată de o enzimă diferită. Astfel, *coenzima* funcţionează în esenţă ca un *cosubstrat*. Conform acestei din urmă descrieri a *coenzimei*, Mottgomery şi colab., au definit termenii de *coenzimă* şi *cofactor* conform rolurilor acestora în cadrul reacţiei catalitice. În timp ce *coenzima* este descrisă ca o moleculă organică implicată direct în cataliză, un *cofactor* (o moleculă organică sau un ion metalic) nu participă direct la cataliză.

Coenzimele pot fi deci împărţite în două grupe :

a) *cosubstrate* - termen care indică faptul că transportându-şi grupa metabolică, *coenzima* se desprinde de centrul catalitic al unei enzime, devenind astfel substrat pentru o reacţie catalizată de o altă enzimă. Rolul lor este acela de a lega diferite căi metabolice în care au loc schimburi de substanţă (ex. H_2, H_3PO_4, ş.a.);

b) *grupe prostetice* - care reprezintă *coenzimele* legate de o enzimă pe tot parcursul ciclului acţiunii catalitice a acesteia, cu alte cuvinte, este o componentă a centrului activ al enzimei respective. Unele *grupe prostetice* nu sunt *coenzime* (în sensul definiţiei), fiind posibil ca acestea să derive din aminoacizii lanţului polipeptidic al enzimelor. Un astfel de exemplu îl reprezintă grupa biocitin a acetil coenzimei A-carboxilazei, care este inclusă covalent în catena polipeptidică.

Un exemplu de grupare prostetică îl reprezintă flavin nucleotidele (figura 1.2) care derivă de la riboflavină sau vitamina B_{12}. Acestea nu pot fi separate de macromolecula proteică (enzimă) fără ca aceasta să se denatureze.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

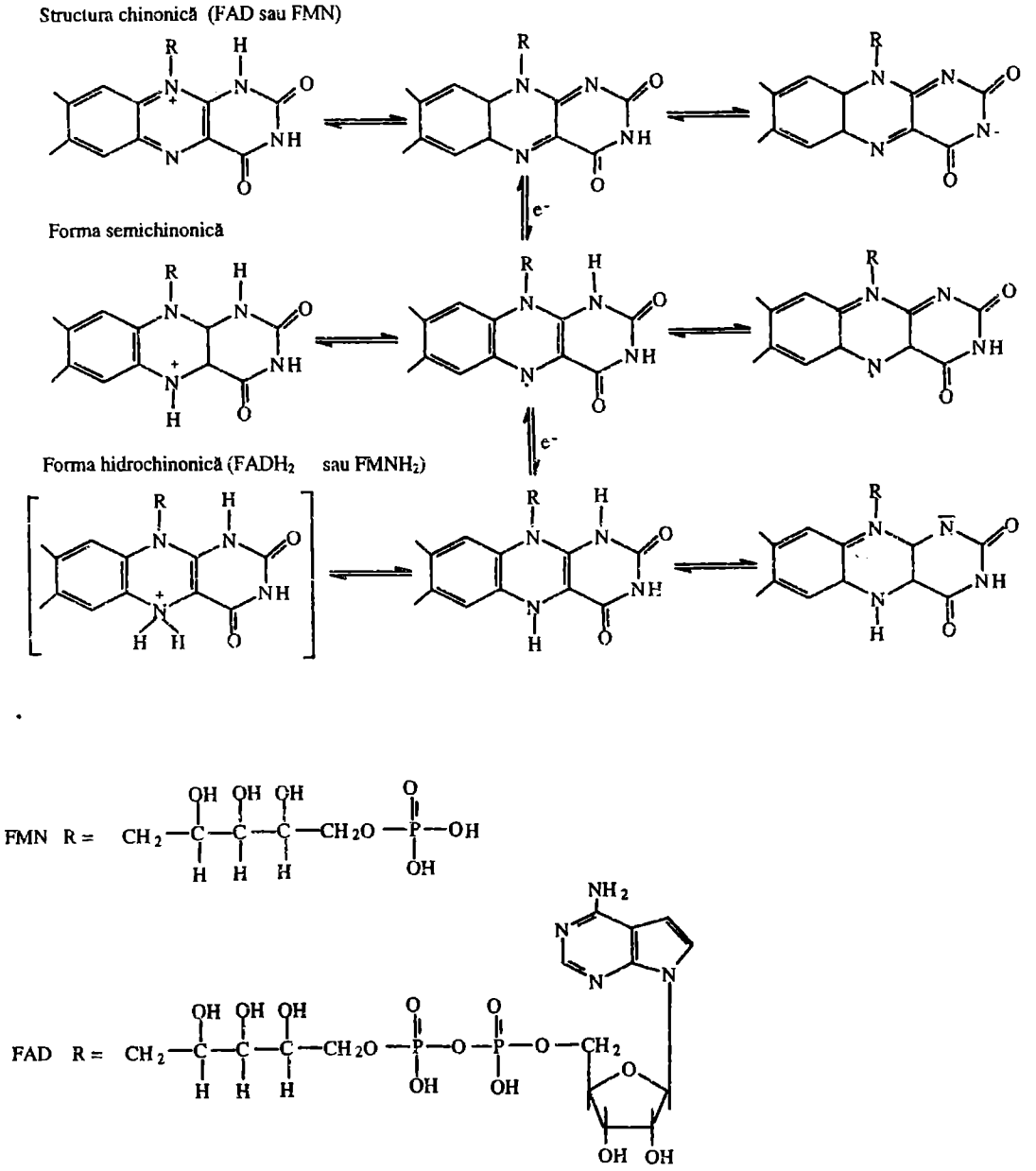


Fig. 1.2 Structura şi chimia redox a grupărilor prostetice flavin adenin dinucleotidei (FAD) şi a flavin mononucleotidei (FMN)

Mecanismul cinetic al reacţiei de oxidare enzimatică a glucozei la acid gluconic, reacţie catalizată de glucoz-oxidază (Gox) şi implicând FAD-ul este redat în continuare:

$$C_6H_{12}O_6 + O_2 \xrightarrow{G_{ox}(E)} -\delta - glucono - lactona + H_2O_2 \qquad (1.1)$$

$$E - FAD + C_6H_{12}O_6 \rightarrow E - FADH_2 + \delta - glucono - lactona \qquad (1.2)$$

$$E - FADH_2 + O_2 \longrightarrow E - FAD + H_2O_2 \qquad (1.3)$$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În cazul flavinenzimelor, reducerea flavinei are loc în două etape succesive, implicând un radical instabil semichinonic (figura 1.2).

Coenzimele slab legate de macromolecula proteică poartă denumirea de *cosubstrate*; acestea se leagă de macromolecula proteică împreună cu alte substrate, dar spre deosebire de *gruparea prostetică*, ele pot fi modificate la sfârşitul reacţiei (procesului catalitic). O astfel de *coenzimă* este reprezentată de nicotinamid dinucleotidele ($NAD^+/NADP^+$) care derivă de la vitamina niacin (acidul nicotinic) ele conţinând un inel piridinic (figura 1.3):

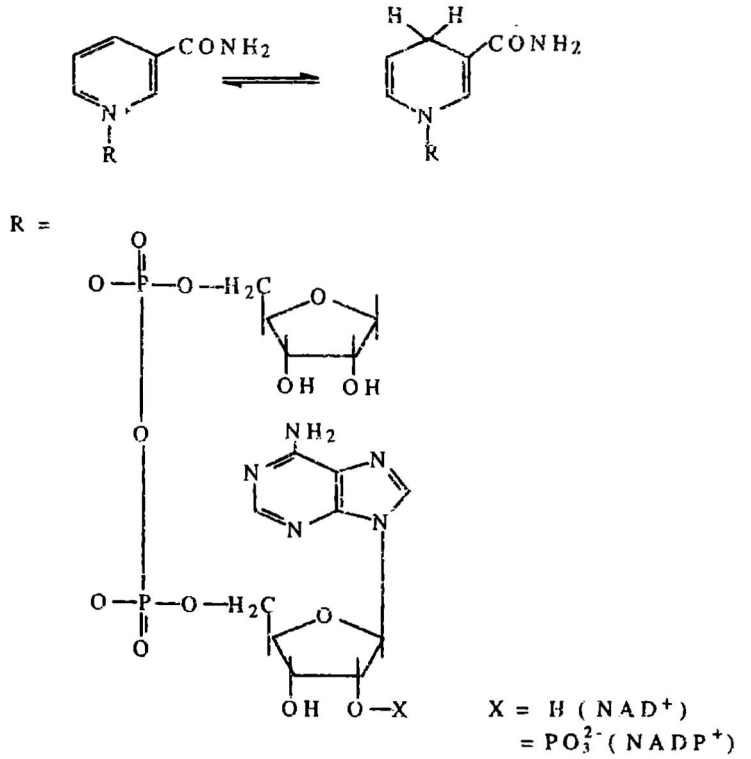


Fig. 1.3. Structurile cuplurilor redox ale coenzimelor $NAD^+/NADP^+$

Mecanismul cinetic al reacţiei catalizate de alcool dehidrogenază (ADH) implică NAD^+ drept coenzimă; reacţia enzimatică catalizată de ADH, pentru un alcool primar şi secundar este redată în continuare:

$$CH_3-CH_2-OH + NAD^+ \xrightarrow{ADH} CH_3-C(=O)-H + NADH + H^+ \quad (1.4)$$

alcool primar

$$R_2CH-OH + NAD^+ \xrightarrow{ADH} R_2C=O + NADH + H^+ \quad (1.5)$$

alcool secundar

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mecanismul cinetic al reacției de oxidare a alcoolilor primari și secundari nu este elucidat. În mecanismul propus se admite inițial faptul că NAD^+ este primul substrat care se leagă de enzimă într-o primă etapă de reacție, ulterior complexul format reacționând cu substratul conform mecanismului prezentat în figura 1.4:

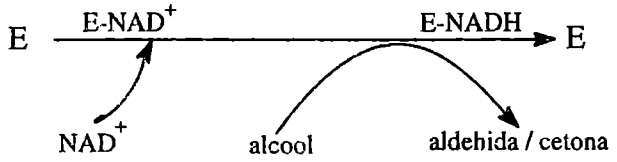


Fig. 1.4 Mecanismul cinetic propus pentru reacția de oxidare a alcoolilor.

Reacția poate fi urmărită spectrometric (λ_{NADH}= 328 nm, λ_{NAD^+} = 350 nm).

În tabelul 1.1. sunt redate principalele *coenzime* și tipurile de reacții enzimatice în care acestea sunt implicate.

Fiecare dintre *coenzimele* prezentate conțin ca parte a structurii lor o moleculă a unei vitamine, sau a unor molecule organice necesare metabolismului celular.

Tab. 1.1. Coenzime implicate în reacțiile de transfer de grupe.

Coenzima	**Gruparea transferată**
Nicotinamid adenin dinucleotida (NAD)	Atomi de H (electroni)
Nicotinamid adenin dinucleotid fosfat (NADP)	Atomi de H (electroni)
Flavin mononucleotida (FMN)	Atomi de H (electroni)
Flavin-adenin dinucleotida	Atomi de H (electroni)
Coenzima Q	Atomi de H (electroni)
Coenzima A	Grupări acil
Piridoxal fosfat	Grupări amino
Coenzimele tetrahidrofolat	Grupări metil, metilen, formil sau formimino
Tiamin pirofosfat	Aldehide
Biocitina	Bioxid de carbon

Coenzimele funcționează în mod uzual că purtători intermediari ai grupărilor funcționale, a atomilor specifici, sau a electronilor care sunt în general transferați în cadrul reacțiilor enzimatice (de ex. grupa biocitin a acetil-CoA carboxilazei care este legată covalent de catena polipeptidică).

În cadrul *cofactorilor* pot fi incluși și *ionii metalici* care participă în mecanismul catalitic al metalo-enzimelor.

Ionii metalici esențiali sunt anionii și cationii specifici a căror prezență este esențială în activitatea unor enzime; aceștii ionii se numesc de obicei *activatori*, însă în acest context se pot numi *cofactori ionici*.

În tabelul 1.2. sunt redate exemple de enzime care necesită *ioni metalici* drept *cofactori*. În cadrul structurii acestor enzime, *ionul metalic* poate servi drept: centru catalitic primar, grupare de legare a substratului de enzimă pentru a forma un complex coordinativ, agent stabilizator al conformației proteinei (enzimei) în forma ei catalitic activă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tab. 1.2. Enzime care necesită sau conţin drept cofactori ioni metalici

Metalul	Enzima
Zn^{2+}	Alcool dehidrogenaza Carboxipeptidaza Carbonic anhidraza
Mg^{2+}	Fosfohidrolaze Fosfotranferaze
Mn^{2+}	Arginaza Fosfotranferaze
Fe^{2+} sau Fe^{3+}	Citocromi, Feredoxina, Peroxidaza, Catalaza
Cu^{2+} (Cu^{+})	Tirozinaza Citocromoxidaza
K^{+}	Piruvat kinaza (necesită şi Mg^{2+})
Na^{+}	ATP-aza din membrane plasmatice (necesită şi K^{+} şi Mg^{2+})

Enzimele care necesită *ioni metalici* pentru a prezenta activitate catalitică sunt denumite uneori *metal enzime*. În cadrul structurii *metal enzimelor*, componentul metalic (numai el exclusiv) posedă o activitate catalitică simplă care este mult mărită de componenta proteică. De exemplu reacţia catalizată de catalază (CAT), enzimă care descompune rapid H_2O_2 la apă şi oxigen, poate fi catalizată şi de către sărurile de fier, dar cu o viteză mult mai mică.

Anumite enzime sunt sintetizate sub forma unor molecule precursoare inactive numite *zimogeni* sau *proenzime*. Trecerea de la starea de *zimogen* la cea de enzimă activă se numeşte *activare*. Termenul de *activare* se mai foloseşte şi în cazul când are loc o creştere a activităţii enzimatice a unei enzime.

Prin *substrat* se înţelege reactantul implicat într-o reacţie catalizată de o enzimă sau într-o reacţie ne-enzimatică şi, deoarece majoritatea reacţiilor sunt formal reversibile, rezultă că produşii de reacţie pot constitui deasemenea substrate.

Prin *produs* se înţelege compusul chimic care rezultă în urma reacţiei directe.

Prin *ligand* se înţelege orice compus chimic care se leagă de o enzimă. Concentraţia unui *ligand* se poate modifica sau nu în cursul reacţiei.

Inhibitorul este acel compus care se leagă de o enzimă ducând la scăderea vitezei reacţiei catalizate enzimatic sau chiar la pierderea acesteia.

În concluzie, un *cofactor* poate fi un *ion metalic* (*activator*) sau o moleculă organică (*coenzimă*), acesta putând fi ataşat mai slab sau mai puternic de o enzimă. Unele enzime necesită pentru manifestarea activităţii catalitice prezenţa atât a *coenzimei*, cât şi a *cofactorului*.

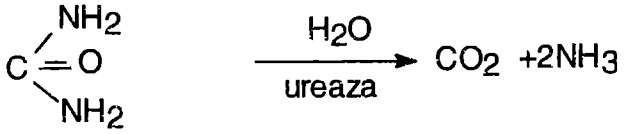
1.2. NOMENCLATURA ŞI CLASIFICAREA ENZIMELOR

Nomenclatura enzimelor se află într-o stare de confuzie în ciuda eforturilor de a le clasifica şi denumi în acord cu specificitatea lor.

În secolul XIX , multor enzime li s-au dat denumiri terminate în "ina", precedat de numele substratului sau cel al sursei enzimatice. Multe din aceste denumiri cum ar fi de exemplu: pepsina, tripsina, emulsina, etc. sunt denumiri utilizate şi astăzi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La sfârşitul secolului XIX s-a sugerat folosirea sufixului "ază" precedat de numele substratului enzimei, propunere acceptată şi folosită şi azi ca un mod general de a denumi enzimele în industrie, exemplu: proteaze, peptidaze, pectinaze, amilaze. Alte exemple sunt ureaza care catalizează hidroliza ureei la amoniac şi bioxid de carbon:



(1.6)

şi arginaza care catalizează hidroliza argininei la ornitină şi uree.

Această denumire s-a dovedit a fi confuză deoarece nu specifică tipul reacţiei catalizate de enzimă. Spre exemplu termenul de protează reprezintă o denumire generică pentru enzimele care hidrolizează legăturile peptidice; acest termen nu este suficient de precis pentru că în el sunt incluse atât endo- cât şi exo-peptidazele.

Acest tip de nomenclatură este folosit deasemenea pentru descrierea generală a grupelor de enzimă. De exemplu, o hidrolază catalizează o reacţie de hidroliză.

Enzimele au fost denumite în acord cu tipul de reacţie catalizate, ca de exemplu invertaza, enzimă care inverteşte sucroza, sau depolimeraza, o enzimă care catalizează transformarea unor substrate polimerice.

Este clar că o nomenclatură bazată parţial pe nume istorice, parţial pe numele substanţelor şi parţial pe numele reacţiilor, nu este satisfăcătoare; deoarece enzimele îşi desfăşoară activitatea în sisteme vii complexe ele au o proprietate esenţială şi anume *specificitatea*. Această proprietate caracteristică a enzimelor stă la baza schemei de clasificare a enzimelor.

În 1956 Uniunea Internaţională de Biochimie a desemnat o comisie pentru a propune o schemă a clasificări şi nomenclaturii enzimelor. În 1961, schema propusă de Comisia Internaţională pentru Enzime, a fost adoptată oficial de către Uniunea Internaţională de Biochimie.

Comisia de Enzime a formulat o listă a regulilor de denumire şi numerotare a enzimelor, şi au fost clasificate peste 800 de enzime.

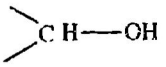
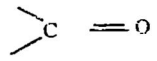
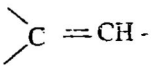
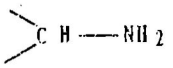
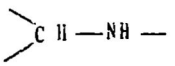
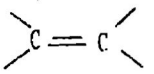
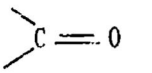
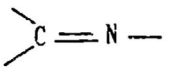
Până în 1973 au fost tabelate peste 1800 de enzime. Împărţirea enzimelor în grupe a fost bazată în principal pe tipul reacţiei catalizate. Nomeclatura menţionată mai sus a fost folosită pentru descrierea grupelor principale de enzime. Astfel, funcţie de tipul reacţiei catalizate, ele au fost împărţite în 6 clase, fiecare clasă fiind sub-divizată în funcţie de substratul şi coenzima sau gruparea chimică implicată în reacţie (tabelul 1.3.):

1. **Oxidoreductaze** (enzime care catalizează transferul atomilor de hidrogen sau oxigen sau al electronilor): enzime care catalizează reacţiile de oxidare şi reducere. În general, pentru enzimele din această clasă se foloseşte numele de dehidrogenaze, majoritatea acestor enzime folosesc ca acceptori sau donori de electroni piridin nucleotidele, flavinele sau citocromii. Alte oxidoreductaze sunt oxidazele şi hidroxilazele, care au drept acceptor de electroni oxigenul şi peroxidazele care au H_2O_2 ca acceptor de electroni.
2. **Transferazele** (enzime care catalizează transferul unor grupe specifice): sunt enzime care catalizează reacţiile de transfer a grupelor funcţionale, cum ar fi gruparea metil sau amino de la un substrat (donor) la altul (acceptor). Majoritatea transferazelor necesită fie prezenţa unei coenzime, fie formarea unui intermediar covalent enzimă-substrat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3. **Hidrolaze** : enzime care catalizează reacţiile de hidroliză şi sunt împărţite funcţie de tipul legăturii hidrolizate.

Tab. 1.3. Clasificarea internaţională a enzimelor (denumirea claselor, numerele de cod şi a tipurilor reacţiilor catalizate); listă parţială

1. **Oxido-reductaze (reacţii de oxido reducere)** 1.1.Acţionând asupra  1.2.Acţionând asupra  1.3. Acţionând asupra  1.4. Acţionând asupra  1.5. Acţionând asupra  1.6. Acţionând asupra NADH; NADPH	**3. Hidrolaze (reacţii de hidroliză)** 3.1. esteri 3.2. legături glicozidice 3.4. legături peptidice 3.5. alte legături C-N 3.6. anhidrie acide **4. Liaze (reacţii de adiţie la duble legături)** 4.1.  4.2.  4.3. 
2.Transferaze (reacţii de transfer al unor grupe funcţionale) 2.1. grupe de carbon 2.2. grupe aldehidice sau cetonice 2.3. grupe acil 2.4. grupe glicozil 2.7. grupe fosfat 2.8. grupe conţinând sulf	**5. Izomerazele (reacţii de izomerizare)** 5.1.Racemaze **6. Ligaze (reacţii de formare de legături prin scindarea ATP-ului)** 6.1. C-O 6.2. C-S 6.3. C-N 6.4 C-C

4. **Liaze**: enzime care catalizează reacţiile de îndepărtare nehidrolitică a grupărilor substituente, exemplu de formare a legăturilor duble prin îndepărtarea nehidrolitică a grupărilor substituente. Liazele includ carboxilazele şi aldolazele.

5. **Izomerazele** : enzime care catalizează reacţii de izomerizare, cum sunt: racemizarea şi/sau izomerizarea legăturilor duble, rearanjarea structurii carbonice, transformarea unui stereoizomer în altul sau transportarea dublei legături dintr-o poziţie în alta.

6. **Ligaze** (enzime care catalizează formarea de legături necesitând prezenţa ATP-ului): deseori denumite sintetaze, catalizează reacţiile de sinteză în care energia potenţială a ATP-ului este folosită în formarea legăturilor.

Comisia Internaţională de Biochimie (1961) a adoptat şi o clasificare sistematică a enzimelor. Ea a creionat o serie de reguli pentru denumirea şi numerotarea enzimelor; totodată, Comisia a stabilit atât denumirea trivială, cât şi sistematică a enzimelor. Deci conform acestei clasificări unei enzime i se atribuie:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1. un nume trivial (recomandat)-majoritatea denumirilor triviale sunt identice cu denumirile folosite anterior acestei scheme de clasificare, în mod uzual. În anumite cazuri, acelaşi nume trivial poate fi folosit pentru mai mult decât o singură enzimă, sau o enzimă este cunoscută sub mai multe denumiri triviale;
2. nume sintetic- în general numele unei enzime constă din două părţi. Prima va consta din numele substratului asupra căruia acţionează sau în cazul reacţiilor bimoleculare din cele două substrate separate prin două puncte. A doua parte terminată în "ază", va indica natura procesului.
3. Un număr de clasificare (sau codul enzimei) – care este format din patru cifre. Prima cifră desemnează una din cele 6 grupe principale. A doua cifră menţionează subclasa, iar a treia, sub-subclasa. Ultima cifră indică numărul de ordine al enzimei în cadrul subclasei. Codul enzimei este precedat de iniţialele EC. El este utilizat acolo unde este necesară o identificare precisă a enzimei. De exemplu în cazul enzimei care catalizează reacţia:

$$ATP + creatina \longleftrightarrow ADP + fosfocreatina$$

i s-a stabilit un nume : nume recomandat – ADP-creatinchinaza
nume sistematic – ATP :creatinfosfotransferaza
un număr de clasificare : EC 2.7.3.2 unde EC înseamnă Comisia de Enzime, 2 numele clasei (transferaze) deci a reacţiei catalizate, 7 desemnează subclasa (fosfotransferaza) indicînd în general substratul sau gruparea implicată, 3 desemnează sub-subclasa (fosfotransferaze cu o grupă de azot ca acceptor) indicînd substratul specific sau coenzima şi 2 desemnează creatinchinaza –numărul de ordine al coenzimei.

1.3. ENZIME CA REACTIVI ANALITICI

Enzimele nu au putut intra mai rapid în practica analitică datorită unor dezavantaje pe care acestea le prezentau şi anume: instabilitate pe parcursul folosirii şi păstrării lor (ceea ce conduce la o activitate variabilă), condiţii speciale de lucru pe care le impun, preţ de cost ridicat, nu puteau fi obţinute într-o stare de puritate analitică precum şi faptului că ele presupuneau procedee analitice complicate care necesitau un timp mare de analiză, conducând la o precizie mică şi nu în final datorită faptului că acestea nu puteau fi folosite în analiza continuă în flux. Toate acestea la un loc au limitat utilizarea enzimelor ca reactivi analitici.

Posibilitatea obţinerii enzimelor în cantitate suficientă la un preţ de cost rezonabil reprezintă încă o problemă, în special în cazul enzimelor descoperite recent sau al enzimelor intracelulare. Preţul de cost mare al enzimelor, limitează utilizarea lor ca reactivi analitici, dacă se ţine cont şi de faptul că tendinţa actuală în cadrul metodelor analitice este deplasată spre procedee automatizate, în care se analizează un număr mare de probe, şi deci se consumă cantităţi mari de reactivi.

Principalul dezavantaj pe care-l prezintă enzimele solubile este legat de instabilitatea lor, ele pierzându-şi activitatea catalitică prin păstrare sau pe parcursul utilizării lor în cadrul procedeelor analitice. Instabilitatea enzimelor este unanim recunoscută, dar cu anumite precauţii efectul ei poate fi minimalizat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

O a treia problemă legată de utilizarea enzimelor ca reactivi analitici, o reprezintă limitările operaționale asociate cu folosirea catalizatorului solubil; în acest sens se poate menționa faptul că, acestea prezintă o stabilitate mecanică redusă și deasemenea faptul că ele nu pot fi refolosite. În soluție enzimele suferă așa numitul proces de denaturare, proces care apare ca rezultat al modificării unor parametrii fizici și/sau chimici (ex. prin modificarea temperaturii sau a pH-ului, enzimele suferă modificări structurale). Dacă condițiile externe în care sunt menținute enzimele se modifică pe o perioadă scurtă de timp acestea se denaturează, dar prin refacerea condițiilor optime de acțiune a lor, enzimele își recapătă activitatea catalitică.

O posibilă stabilizare a structurii enzimatice se realizează prin fixarea acestora (imobilizare) pe diferite suporturi organice sau anorganice (figura 1.5).

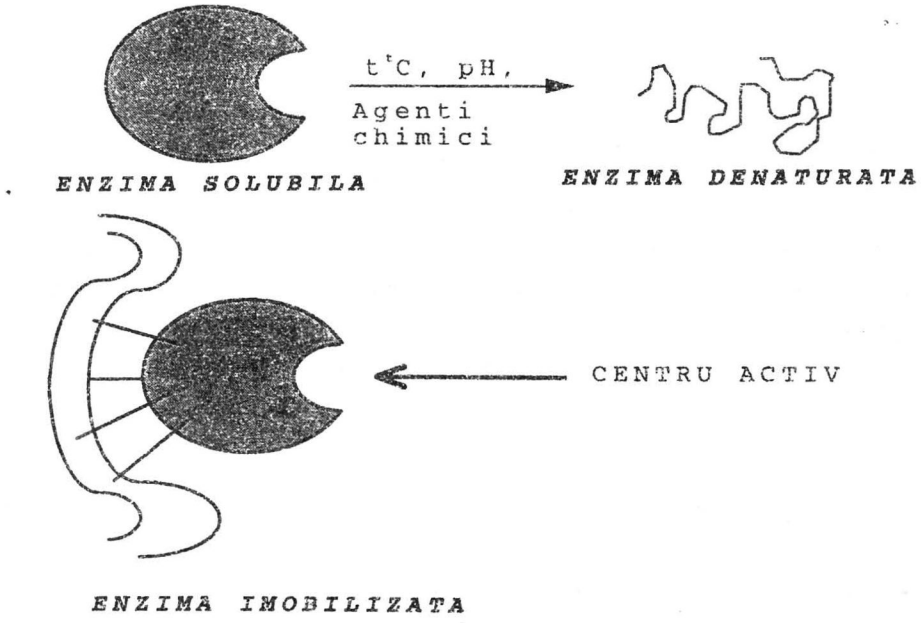


Fig. 1.5 Modificarea structurii enzimei datorită modificării unor parametrii fizico-chimici; posibila stabilizare a enzimei prin imobilizare.

Odată cu dezvoltarea tehnicilor de imobilizare a enzimelor, s-a înlăturat principalul dezavantaj menționat mai sus, care limita utilizarea enzimelor ca reactivi analitici.

Enzimele imobilizate precum și cele solubile, pot fi folosite pentru determinarea concentrației unui substrat specific al unei enzime, a unui inhibitor care inactivează enzima, sau al unui activator care conduce la mărirea activității acesteia, a coenzimelor precum și pentru determinarea enzimelor.

La ora actuală, există enzime cu o activitate specifică mare la un preț de cost rezonabil; de asemenea ultimele două dezavantaje sunt mai de grabă o consecință a metodelor și tehnicilor utilizate decât una datorată enzimei.

Prin apariția unor noi tehnici analitice, precum și prin dezvoltarea celor existente s-au eliminat o parte din dezavantajele menționate. În plus posibilitatea automatizării reacțiilor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

enzimatice a condus la mărirea vitezei, a uşurinţei şi reproductibilităţii determinărilor bazate pe enzime.

Elaborarea procedeelor de obţinere a enzimelor de puritate analitică, cu activitate specifică mare la un preţ de cost rezonabil, împreună cu dezvoltarea tehnicilor de imobilizare, precum şi cu dezvoltarea unor noi tehnici analitice, au făcut ca preparatele de enzime imobilizate să substituie enzimele solubile şi să fie din ce în ce mai mult utilizate în cadrul procedeelor analitice. S-a ajuns astfel, ca, analizele enzimatice să devină suficient de sensibile, precise, reproductibile putând fi totodată uşor automatizate.

Datorită acestor progrese, în ultimii ani enzimele au fost unanim acceptate ca reactivi analitici, iar metodele enzimatice de analiză au fost aplicate cu succes în diferite domenii (biochimie, chimie clinică, controlul poluării mediului ş.a.).

1.4. METODE DE IMOBILIZARE A ENZIMELOR

Termenul de imobilizare a enzimelor se referă la procesul de localizare fizică a moleculelor de enzimă, pentru a fi utilizate în cadrul unui proces catalitic continuu.

Utilizarea enzimelor imobilizate în cadrul sistemelor analitice oferă o serie de avantaje comparativ cu folosirea celor solubile. Un prim avantaj constă în faptul că forma fizică a enzimei imobilizate face posibilă o utilizare economică a acesteia în cadrul proceselor analitice continue sau semicontinue. În general, în cazul utilizării enzimelor solubile ca reactivi analitici o cantitate fixă de reactiv este folosită pentru fiecare determinare, ea neputând fi recuperată în scopul refolosirii ei; în acest mod nu se atinge întreg potenţialul catalitic al enzimei. Prin folosirea enzimelor imobilizate, o cantitate fixă de preparat enzimatic, poate fi folosită pentru efectuarea unui număr mare de analize, acesta putând fi uşor de recuperat şi refolosit, astfel reducându-se mult cantitatea de enzimă pentru fiecare analiză.

Un alt avantaj constă în aceea că prin imobilizare, enzimele sunt plasate într-un mediu mai apropiat de cel natural, ceea ce face ca acestea să prezinte o stabilitate mărită în timp, cât şi faţă de variaţiile de temperatură, pH, tărie ionică, sau faţă de acţiunea diferiţilor inhibitori.

Un ultim avantaj, care este o consecinţă a primelor două, este acela că enzimele imobilizate pot fi utilizate în cadrul analizelor chimice sau biochimice mult mai economic decât enzimele solubile. Acest lucru rezidă din faptul că enzimele imobilizate pot fi utilizate fie repetitiv, fie continuu, datorită formei lor fizice şi stabilităţii mărite, ceea ce face ca acelaşi preparat să fie folosit pe o perioadă mai mare de timp, eliminându-se necesitatea preparării reactivilor enzimatici în laborator.

În scopul imobilizării enzimelor se utilizează două metode majore şi anume: chimice şi fizice. Metodele chimice presupun formarea a cel puţin unei legături covalente (sau parţial covalente) între catenele laterale ale proteinelor (enzimelor) şi un polimer funcţional insolubil în apă sau între două sau mai multe molecule de enzimă. În realitate, între componenţii care interacţionează se formează mai mult decât o legătura covalentă. Metodele chimice de imobilizare sunt ireversibile, enzima fiind imposibil de recuperat sau regenerată.

Metodele fizice, includ acele tehnici care nu conduc la formarea legăturilor chimice covalente; imobilizarea se realizează prin acţiunea forţelor fizice (interacţii electrostatice, legături ionice ş.a.) sau prin entrapare (includere) în interiorul unor matrice de polimeri sau al microcapsulelor. În tabelul 1.4, se prezintă clasificarea metodelor de imobilizare, fiind incluse şi o serie de metode specifice utilizate în acest scop.

BIBLIOTECA CENTRALĂ BUCUREŞTI

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Modul în care se realizează imobilizarea, prezintă o importanţă funcţională; astfel prin imobilizare chimică, enzima este accesibilă substratelor de orice dimensiuni, în timp ce în cazul enzimelor imobilizate fizic sau prin entrapare, acestea sunt izolate de substratele de dimensiuni moleculare mari. Deci, pentru determinarea substratelor de dimensiuni moleculare mari ex. proteine trebuiesc utilizate enzime (proteaze) imobilizate covalent; pentru determinarea substratelor mici (uree, glucoză) pot fi folosite oricare dintre cele două tipuri de enzime imobilizate. Cele două tipuri de enzime imobilizate, diferă din punct de vedere al cineticii şi al interferenţelor posibile.

Tab. 1.4 Sistemul de clasificare al metodelor folosite pentru imobilizarea enzimelor [2]

A) *Metode chimice* (presupun formarea unor legături covalente):
• Fixarea moleculelor de enzimă de un polimer funcţional insolubil în apă;
• Includerea moleculelor de enzimă într-un lanţ de polimer în formare;
• Legarea încrucişată covalentă intermoleculară a enzimei prin intermediul unui agent multifuncţional de greutate moleculară mică.
B) *Metode fizice* (presupun formarea unor legături necovalente):
• Adsorbţia enzimei pe matrici insolubile în apă;
• Entraparea enzimei în interiorul unei matrici de gel insolubilă în apă;
• Entraparea enzimei în interiorul microcapsulelor semipermeabile.

Prin imobilizare chimică sau fizică, în urma interacţiunii moleculelor de enzimă cu suporturile respective, poate avea loc o modificare a structurii centrului activ, uneori acesta fiind chiar blocat, ceea ce conduce la scăderea sau pierderea capacităţii catalitice.

Metodele de legare chimică, conduc la obţinerea unui preparat enzimatic care poate fi utilizat de câteva mii de ori în cadrul metodelor analitice, în timp ce preparatele enzimatice obţinute prin entrapare sau adsorbţie pot fi folosite de zeci sau chiar sute de ori în astfel de determinări.

În concluzie, se poate afirma faptul că, în cazul utilizării enzimelor solubile, în cadrul analizei enzimatice se consumă cantităţi mari de enzimă, spre deosebire de cazul utilizării enzimelor imobilizate.

Dintre biocomponenţii utilizaţi în construcţia biosensorilor, cel mai adesea au fost utilizate enzimele, datorită proprietăţilor acestora, care au fost prezentate mai sus. Totuşi, multe dintre metode şi tehnici, sunt în general aplicabile pentru majoritatea biocomponenţilor.

Prin imobilizarea enzimei se presupune ca are loc o creştere a stabilităţii şi a capacităţii catalitice, acestea conducând la o micşorare a timpului de reacţie şi în final a sensibilităţii metodei.

Se vor descrie succint principalele metode de fixare a enzimelor pe diferite suporturi organice şi anorganice, prezentându-se totodată avantajele şi dezavantajele acestor metode în analiza biochimică.

Orice metodă de imobilizare trebuie să ţină cont de o serie de factori şi anume: posibilitatea fixării pe diferite suporturi; prin imobilizare, biocomponentul trebuie să prezinte o activitate maximă, stabilitate pe un domeniu larg de pH, să prezinte o stabilitate termică mai mare faţă de enzima din soluţie, iar desprinderea biocomponentului de pe suprafaţa suportului să fie minimă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1.4.1. ADSORBȚIA

Adsorbția biocomponentului pe suprafața diferitelor suporturi reprezintă una dintre cele mai simple și des utilizate tehnici pentru fixarea biocomponenților (figura 1.6). Dintre suporturile utilizate se menționează rășinile schimbătoare de ioni, cărbunele activ, silicagelul, oxidul de aluminiu, sticla poroasă și ceramică ș.a.

Printre avantajele acestei tehnici se menționează faptul că: aceasta nu necesită reactivi speciali, structura enzimei rămâne practic nemodificată, denaturarea macromoleculelor proteice este minimă.

Deoarece adsorbția unei proteine pe un suport oarecare este în principiu un proces reversibil, modificările de pH, concentrație ionică și de temperatură pot duce la desprinderea macromoleculei proteice.

Dintre dezavantajele metodei se menționează: o dependență mărită față de pH, temperatură și tărie ionică, precum și faptul că necesită un grad mai mare de optimizare a condițiilor de imobilizare și de lucru.

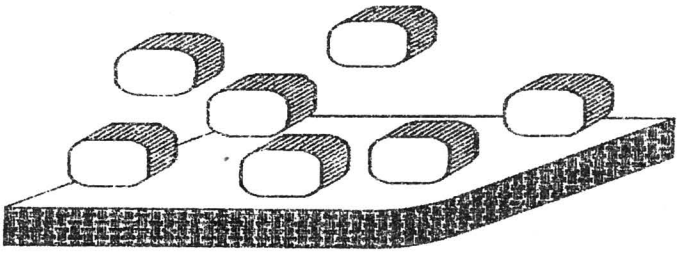


Fig. 1.6 Reprezentarea schematică a metodei de adsorbție

Metoda nu se aplică pe scară largă, pentru că biocomponentul se poate desprinde de pe suprafața suportului (a matricei), acest neajuns putând fi minimalizat prin utilizarea concomitentă a tehnicii de legare încrucișată. Adsorbția se realizează în mod practic prin evaporarea la 4°C a unei soluții tampon conținând enzima. Ea poate fi urmată de legarea încrucișată a macromoleculelor de enzimă.

1.4.2. LEGAREA COVALENTĂ

Tehnicile de imobilizare covalentă (figura 1.7) sunt mai dificil de realizat comparativ cu metoda adsorbției. Acestea conduc însă la obținerea unui preparat enzimatic care prezintă stabilitate ridicată având totodată aplicații multiple.

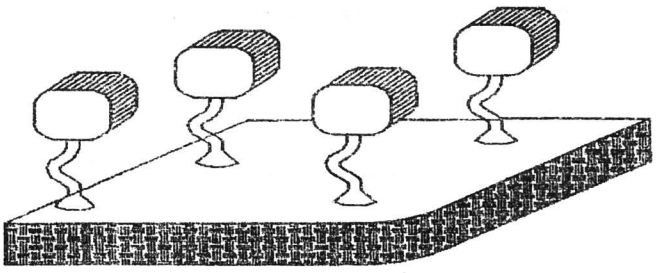


Fig. 1.7 Diagrama legării covalente

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Legarea covalentă implică 3 etape: activarea suportului, cuplarea enzimei şi îndepărtarea enzimei nelegate. Activarea suportului este de obicei realizată cu diferiţi reactivi chimici dintre care se menţionează derivaţii silanici şi cianurile halogenate (BrCN, ClCN). În etapa ulterioară enzima reacţionează cu suportul activat, urmând etapa de îndepărtare a enzimei nelegate de suport prin spălarea acestuia din urmă. Fiecare dintre cele trei etape menţionate trebuiesc optimizate. În condiţiile legării covalente a biocomponenţilor trebuie ţinut cont de o serie de factori care influenţează în final activitatea catalitică şi stabilitatea biocomponentului.

1.4.3 ENTRAPAREA

Metodele de entrapare (sau includere) a enzimelor în diferite geluri sau polimeri presupun: condiţii blânde de imobilizare, biocomponenţii putând fi foarte uşor incluşi în matrice în concentraţie mare, o varietate mare de geluri şi polimeri care pot fi folosiţi; metoda poate fi îmbunătăţită prin utilizarea simultană a altor tehnici de imobilizare cum sunt legarea încrucişată şi covalentă. Dintre dezavantajele metodei se poate menţiona faptul că pentru realizarea ei trebuie controlaţi un număr mare de factori experimentali, biocomponentul poate fi denaturat prin interacţie cu radicalii rezultaţi pe parcursul formării polimerului, conduce la realizarea unei bariere difuzionale mari.

1.4.4. LEGAREA ÎNCRUCIŞATĂ

Adsorbţia fizică şi entraparea în gel este de obicei urmată de legarea încrucişată a macromoleculelor proteice (figura 1.8) pentru a prevenii pierderea (desprinderea) biocomponentului. Cea mai cunoscută utilizare a acestei metode este aceea de realizare de membrane enzimatice prin folosirea unor agenţi bifuncţionali (ex. glutaraldehida, bis izocianatul sau derivaţi ai acestuia) care să lege biocomponentul.

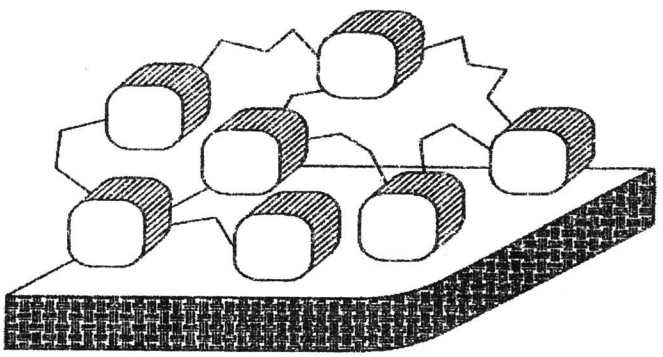


Fig. 1.8 Diagrama legării încrucişate

Dificultatea acestei metode constă în faptul că, trebuiesc stabilite condiţiile optime de formare ale membranelor (pH, temperatură, tărie ionică şi timpul de reacţie).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1.4.5 ELECTROPOLIMERIZAREA

Electropolimerizarea este o metodă simplă de imobilizare a enzimelor pe suprafaţa electrozilor. Enzima şi mediatorul se fixează odată cu monomerul utilizat (ex. cobalt sau fero-ftalocianina) pe suprafaţa electrozilor (ex. cărbune sticlos) procedeu care se realizează prin baleerea potenţialului pe un anumit domeniu (ex. -0,2 - +1,0 V faţă de Ag/AgCl) şi cu o anumită viteză de baleere a acestuia.

În tabelul 1.5 sunt redate principalele metode de imobilizare ale enzimelor, şi deasemenea principalele lor avantaje şi dezavantaje analitice.

Tab.1.5 Procedee de imobilizare a enzimelor

Metoda	Avantaje	Dezavantaje
1. Adsorbţia pe matrici insolubile	Simplă, condiţii de lucru blânde, fără distrugerea (denaturarea) enzimei.	Legăturile enzimei cu suportul, sunt puternic dependente de pH, solvent şi temperatură.
2. Entraparea în gel	Metodă general aplicabilă enzimelor, presupune condiţii blânde de reacţie.	Bariere difuzionale largi, pierderea activităţii enzimei, posibila denaturare a moleculei enzimei ca rezultat al apariţiei unor radicali liberi.
3. Legarea covalentă de o membrană sau de un suport insolubil (celuloza, dextranul colagenul, gelatina, albumina, policlorura de vinil, sticla poroasă)	Complexul enzimă-suport este stabil, metoda este ideală pentru producţia în masă şi comercializare a preparatelor enzimatice.	Tehnica complicată, timp de lucru mare, posibilitatea pierderii activităţii datorită reacţiilor în care sunt implicate grupările esenţiale pentru activitatea biochimică.
4. Legarea încrucişată prin intermediul unui agent multifuncţional (cum ar fi glutaraldehida)	Procedeu simplu, presupune formarea unor legături chimice puternice îintre biomolecule şi suport, larg folosită în stabilizarea fizică a enzimelor adsorbite pe un suport.	Dificultăti în controlul reacţiei, necesită o cantitate mare de enzimă, activitate enzimatică relativ mică după imobilizare.
5. Electropolimerizarea	Procedeu relativ simplu, se poate controla grosimea stratului de polimer sau film obţinut precum şi cantitatea de enzimă inclusă în acesta, se poate folosi uşor la realizarea microelectrozilor.	Mecanismul proceselor cinetice de electropolimerizare este încă neelucidat.

1.5. APLICAŢIILE EZIMELOR ÎN CHIMIA ANALITICĂ

O dată cu progresele realizate în domeniul ingineriei genetice, cu posibilitatea obţinerii enzimelor într-un grad de puritate avansat precum şi cu progresele realizate în domeniul tehnicilor de imobilizare a enzimelor, acestea au găsit largi aplicaţii în diferite

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

domenii cum ar fi: chimia analitică, controlul alimentelor, analize clinice, controlul mediului şi al biotehnologiilor.

1.5.1 REACTOARE ANALITICE ENZIMATICE

În cadrul laboratoarelor analitice în care se efectuează sute de detrminări sunt necesare realizarea şi utilizarea unor metode automate pentru efectuarea analizelor de rutină. La ora actuală sunt comercializate o serie de analizoare automate care sunt folosite ca echipament standard în majoritatea laboratoarelor biochimice. Cu toate acestea, multe dintre ele au la bază enzimele solubile şi folosesc reactivi de culoare în scopul monitorizării reacţiilor. Acest lucru conduce la o creştere a preţului de cost/analiză deoarece enzima nu poate fi refolosită.

O posibilă soluţie la această problemă o reprezintă utilizarea enzimelor imobilizate care pot fi reutilizate. Majoritatea analizoarelor automate funcţionează în sistem de flux continuu, în care probele şi reactivii sunt introduşi printr-un sistem de canale şi camere de amestecare ajungînd în final la detector. Un sistem tipic este redat în figura 1.9.

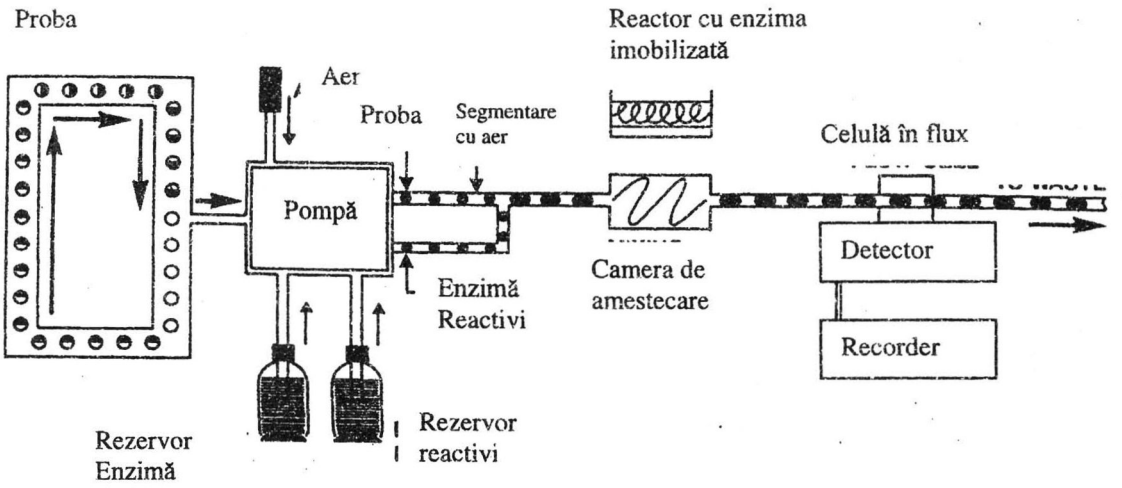


Fig. 1.9 Reprezentarea schematică a unui sistem simplu de analiză automată în flux [3]

Reactorul enzimatic reprezintă configuraţia cea mai adecvată pentru utilizarea enzimelor imobilizate. Acestea au la bază un compartiment de curgere în flux care include enzima imobilizată. Proba conţinând substratul ajunge în acest compartiment, unde are loc reacţia enzimatică rezultând produşii de reacţie. În cadrul analizoarelor automate, practic, reactorul enzimatic înlocuieşte camera de amestecare. In cadrul analizei în flux cel mai adesea au fost studiate două tipuri de reactoare enzimatice cel tubular şi cel sub formă de strat împachetat (figura 1.10).

În sistemul tubular, enzima este fixată pe suprafaţa internă a tubului (tuburile de naylon sunt adecvate acestui scop).

În reactorul sub formă de pat împachetat enzima este imobilizată de exemplu pe straturi poroase sau în interiorul unor fibre, ulterior preparatul enzimatic astfel obţinut fiind

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

introdus (împachetat) într-un tub de plastic sau sticlă obținându-se astfel un mic reactor enzimatic sub formă de coloană.

Ambele sisteme sunt eficente în ceea ce privește înlocuirea enzimei solubile, ambele având avantaje și dezavantaje. Timpul de răspuns este similar cu cel obținut folosind un electrod enzimatic.

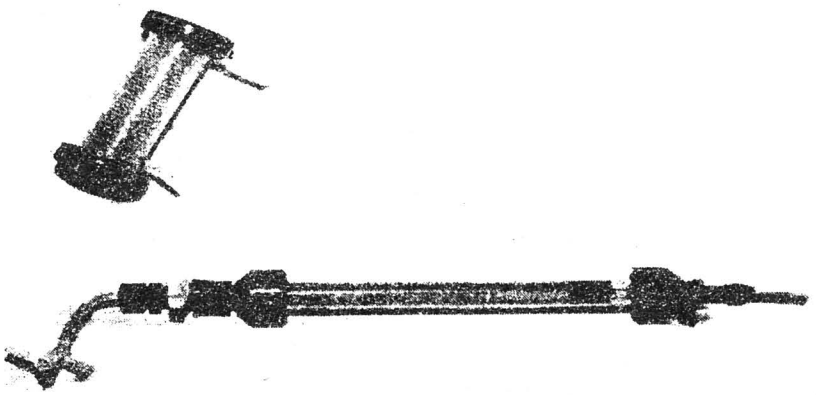


Fig. 1.10 Reactor sub formă de coloană (pat împachetat) –dreapta- conținând alcool dehidrogenaza legată covalent de agaroză și rector enzimatic tubular (spirală) –stânga- conținând glucoz-dehidrogenaza fixată pe tuburi de naylon. Reactoarele au fost folosite pentru determinarea alcoolului și respectiv a glucozei [3].

1.5.2 APLICAȚIILE ENZIMELOR ÎN CONTROLUL CALITĂȚII ALIMENTELOR

O mare parte din industria alimentară se bazează pe procesarea și prepararea unui material perisabil rezultat din plante și animale. În cele mai multe cazuri alimentele constau din țesuturi moarte, precum și din organe și organisme aflate în diferite stadii de descompunere; de aceea este importantă monitorizarea integrității produselor alimentare, dat fiind faptul că acestea trec prin diferite stadii de procesare, până la obținerea produsului final care trebuie să fie nealterat și să atragă consumatorul.

Enzimele au fost utilizate pentru determinarea (analiza) unui număr mare de substanțe din produsele alimentare plecând de la conținutul de alcool din vin până la determinarea concentrației insecticidelor reziduale din țesuturile plantelor. Deasemenea, determinarea enzimelor interne, reprezintă un indicator al unei etape de procesare a alimentelor. Eficiența pasteurizării laptelui poate fi estimată prin determinarea activității invertazei înainte și după pasteurizare. O pasteurizare eficientă trebuie să conducă la o inactivare substanțială a enzimei.

În scopul menținerii unor standarde ridicate în industria alimentară, enzimele au fost utilizate pentru determinarea calității inferioare a unor substituenți introduși în produsele alimentare.

Un exemplu reprezentativ relativ la aplicațiile enzimelor în analiza alimentelor îl reprezintă metodele utilizate în controlul calității cărnii. Controlul calității preparatelor din carne s-a realizat utilizând un electrod enzimatic sau printr-o metodă imunochimică.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Una dintre caracteristicile fundamentale ale vieţii îl reprezintă controlul permanent al proceselor metabolice din celule şi dintre ţesuturi. În viaţă există un echilibru dinamic între degradare şi biosinteza macromoleculelor care asigură generarea continuă a componentelor de bază pentru formarea compuşilor care întreţin şi reproduc viaţa. După moarte acest control dispare. Deasemenea enzimele responsabile pentru degradare, care în mod normal există sub un control metabolic riguros sunt eliberate în mediu; ele conduc la o descompunere a ţesuturilor şi celulelor, proces în urma căruia rezultă o serie de compuşi de degradare cum sunt amoniacul, aminele, carboxilaţii, bioxidul de carbon ş.a. Acumularea acestor molecule simple creează un mediu ideal pentru creşterea bacteriilor, drojdiilor şi a fungiilor. Aceste organisme produc o degradare avansată a cărnii, având ca efect modificarea culorii şi mirosului acesteia. Deoarece, bacteriile produc alterarea alimentelor nu se recomandă consumarea acestora din urmă în stare de degradare. Estimarea prospeţimii cărnii şi a produselor din carne, reprezintă un indicator important pentru calitatea acestor produse obţinute în industria alimentară.

În concluzie, înainte de a fi comercializate alimentele trebuie supuse unui control analitic de calitate care vizează: prospeţimea cărnii şi a peştelui, nivelul de glucide, conţinutul de alcool al băuturilor, conţinutul în aditivi toxici.

Metoda clasică de analiză a prospeţimii cărnii constă în determinarea conţinutului de amoniac rezultat la hidroliza acidă a azotului organic total (test Kjeldahl) - o analiză de durată incluzând o serie de etape (extracţii, distilări şi titrări). În ultimii ani a fost propusă ca metodă alternativă folosirea unui electrod enzimatic pentru determinarea monoaminelor (histamina, tiramina) rezultate din decarboxilarea aminoacizilor eliberaţi în timpul protolizei proteinelor din carne. Deoarece în timpul procesului de degradare al cărnii rezultă o serie de amine, monitorizarea acestor substanţe poate reprezenta un bun indicator al prospeţimii preparatelor din carne.

Monoaminele pot fi determinate folosind un electrod enzimatic având la bază un sensor de oxigen şi enzima monoamin oxidaza care catalizează reacţia:

$$RCH_2 + 0_2 + H_20 \xrightarrow{\text{monoaminoxidaza}} RCHO + H_20_2 + NH_3$$

Sensorul de oxigen determină scăderea concentraţiei de oxigen din sistem datorată oxidării monoaminei. Curentul electric generat este direct proporţional cu concentraţia de monoamină. În comparaţie cu metoda Kjeldahl de analiză, metoda enzimatică este una simplă, rapidă şi economică care poate fi utilizată în analize de rutină.

Similar, a fost propusă o metodă pentru determinarea hipoxanthinei din carnea de peşte folosind un eletrod pe bază de xantinoxidază şi ca mediator hexacianoferat (II).

Pentru dozarea glucidelor (glucoza, sucroza, lactoza, amidon) există deja o serie de analizoare pe bază de biosenzori produse de Yellow Springs Analyser. Deşi cerinţa unei astfel de analize în industria alimentară este mare, introducerea noilor metode de analiză bazate pe folosirea reactivilor enzimatici se face încet datorită condiţiilor de lucru speciale pe care le presupun.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1.5.3. APLICATIILE ENZIMELOR ÎN LABORATORUL CLINIC

Laboratorul clinic de biochimie reprezintă o componentă cheie a oricărui spital modern. Principala sa utilitate este de a efectua o serie de analize ale substanţelor prezente în probe biochimice cum sunt sânge, urină, fecale, lichid cerebro-spinal, măduvă, ş.a.

Analizele conduc la generarea de informaţii care contribuie şi facilitează detecţia şi diagnosticarea anumitor boli şi/ sau dereglări metabolice. Datele analitice obţinute contribuie totodată la controlul şi monitorizarea tratamentului medical, de ex. poate fi vitală determinarea concentraţiei unui medicament în sânge în scopul stabilirii dozei optime în cadrul unui tratament medical bun sau poate genera date privind relaţia dintre concetraţia medicamentului şi efectele dăunătoare ale acestuia. Numărul de analize diferite care pot fi efectuate în cadrul unui laborator bioanalitic dintr-un spital poate fi de cel puţin 20000/săptămână. Cel puţin 20% din aceste analize pot avea la bază enzimele ca reactivi analitici, deci enzimele au un rol important în cadrul analizelor clinice, tendinţa actuală fiind aceea de a fi. din ce în ce mai mult folosite în cadrul procedeelor analitice.

În cele ce urmează se vor prezenta o serie de tehnici analitice cu posibile aplicaţii, în laboratoarele clinice, având la bază enzimele.

Metodele spectrometrice de analiză sunt foarte bune pentru determinări *in vitro*, dar aparatura este complexă şi pregătirea probelor poate fi de durată. O alternativă valabilă o oferă de multe ori folosirea biosenzorilor - care pot genera un răspuns direct şi rapid având la bază o aparatură simplă şi ieftină.

Estimarea glucozei din serul sanguin, este una dintre cele mai des întâlnite analize efectuate în laboratoarele clinice; într-o săptămână în cadrul unui laborator, poate fi necesară efectuarea a 1500 de determinări de glucoză.

Glucoza rezultă în organism, în principal din degradarea carbohidraţilor din alimentele folosite în dieta zilnică. Aceasta este oxidată de celulele din organism proces în urma căreia se produce energie chimică (ATP) necesară activităţilor celulare. Concentraţia optimă de glucoză din sânge este cuprinsă între 80-100 mg/100 cm^3, fiind esenţială în cadrul metabolismului glucidic. Un nivel constant de glucoză este menţinut printr-o serie de mecanisme complexe implicând şi diferiţi hormoni, incluzând şi insulina. Dacă, conţinutul de glucoză scade sub 50 mg/100 cm^3 (hipoglicemie), apar o serie de manifestări clinice diferite de acelea în care concentraţia de glucoză depăşeşte 180mg/100 cm^3 (hiperglicemie), caz în care sângele devine acid şi glucoza este eliminată în urină. În ambele cazuri consecinţele pot fi fatale dacă concentraţia de glucoză nu este adusă la limite normale.

Insulina joacă un rol important în reglarea concentraţiei de glucoză din sânge şi în cazul bolnavilor cronici de diabet, producerea acestui hormon încetează sau este substanţial redusă. În această situaţie, concentraţia de glucoză din sânge creşte, celulele nefiind capabile să consume glucoza din sânge. Un prim diagnostic de diabet, pentru un pacient, poate indica o concentraţie de glucoză de aproximativ 700 mg/100 cm^3. În cadrul unui organism sănătos concentraţia de glucoză este monitorizată de către pancreas, care odată cu creşterea concentraţiei de glucoză, eliberează o cantitate suficientă de insulină în sânge; insulina are rolul de a metaboliza glucoza şi prin aceasta are loc o scădere a glucozei din sânge la un nivel normal.

În cazul bolnavilor de diabet este necesară administrarea prin injectare a unei cantităţi corecte de insulină. Diabetul cronic este o boală des întâlnită (aprox. 2% din populaţia

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

României suferă de această boală) şi de aceea sunt necesare metode de determinarea a glucozei în sânge şi urină.

Metodele chimice reprezintă, metodele clasice de determinare a glucozei, bazată pe proprietăţile ei reducătoare. Reactivi chimici utilizaţi în cadrul metodelor, nu erau specifici pentru glucoză deoarece şi alţi componenţi din sânge erau capabili să-i reducă. Utilizarea glucoz-oxidazei nu a înlăturat problema specificităţii cu toate că enzima este destul de specifică pentru glucoză (figura 1.11), dar metodele utilizate pentru determinarea apei

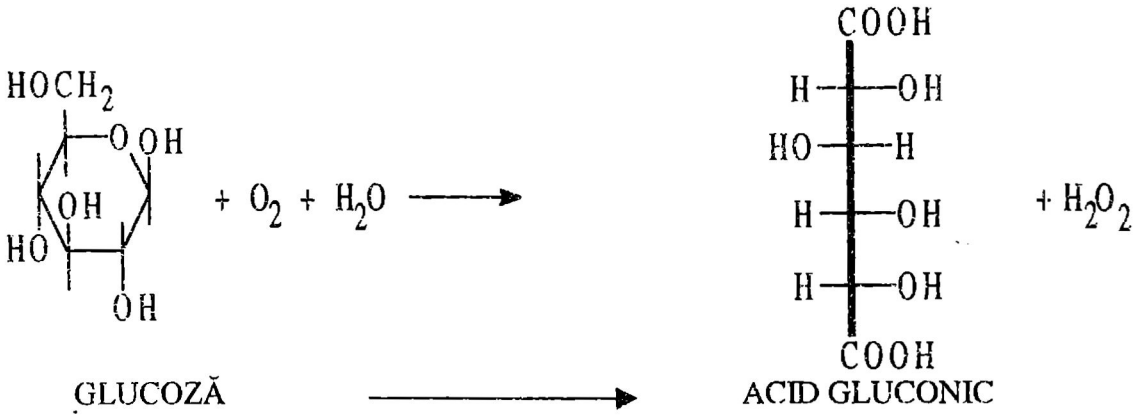


Fig 1.11. Reacţia catalizată de glucoz-oxidază. Enzima catalizează oxidarea glucozei la glucono-lactonă (ne-redată) care hidrolizează spontan formând acid gluconic. Oxigenul este utilizat ca acceptor de hidrogen formând H_2O_2.

oxigenate, nu erau specifice. Pentru mărirea specificităţii s-a folosit o reacţie enzimatică cuplată cu prima (care poartă denumirea de reacţie indicatoare), reacţie catalizată de peroxidază:

$$H_2O_2 + \text{cromogen (incolor)} \xrightarrow{\text{peroxidază}} \text{cromogen oxidat (albastru)} + H_2O$$

Necesitatea utilizării unui sistem de reacţii enzimatice cuplate, presupunând folosirea mai multor enzime nu este avantajos din punct de vedere economic (datorită preţului de cost ridicat al enzimelor).

În ultimii ani analiza enzimatică a glucozei se efectuează folosind o enzimă bacteriană descoperită recent şi care poartă denumirea de glucoz-dehidrogenază. Această enzimă combină specificitatea detecţiei cu generarea unui semnal specific.

$$\text{Glucoză} + NAD^+ \xrightarrow{\text{glucoz-dehidrogenază}} \text{acid gluconic} + NADH + H^+$$

Enzima necesită participarea cofactorului NAD^+ care acţionează ca acceptor de hidrogen. Forma redusă a acestuia NADH, poată fi detectată spectrometric la 340 nm. În

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

perspectivă, această enzimă va înlocui sistemul enzimatic cuplat menţionat mai sus, pentru determinarea cantitativă a glucozei.

Pentru determinarea glucozei, s-a realizat un aparat simplu bazat pe un electrod enzimatic de unică folosire, care utilizează ca probă o picătură de sânge. Timpul de răspuns este de 30s. Comparând rezultatele obţinute pe probe de ser prin metoda enzimatică clasică cu cele obţinute cu ajutorul electrodului enzimatic pe probe de sânge integral, se constată o diferenţă sistematică de 5 - 8% în minus pentru cel de-al doilea caz, variaţiile fiind datorate tipului de analizator. La interpretarea rezultatelor trebuie avută în vedere această diferenţă.

Un deziderat îl constituie monitorizarea intravenoasă a glucozei. Acest lucru se poate realiza cu ajutorul unui microelectrod sau a unui biosenzor cu fibre optice. Realizarea unui biocip pentru măsurători *in vivo* prezintă următoarele avantaje: posibilitatea de a măsura variaţii mici ale curentului (de ordinul 10^{-16} A); rezistenţa chimică mică , datorită scăderii dimensiunii, viteza proceselor de transport spre suprafaţă creşte; curenţi capacitivi mici; prezintă caracteristici de răspuns (semnal/zgomot) foarte bune; sunt ieftini şi uşor de realizat în serie.

Un parametru important pentru diagnosticarea rinichiului şi pentru controlul dializei renale îl constituie nivelul de uree în sânge. Pentru determinarea ureei s-au realizat senzori potenţiometrici pe bază de urează.

O altă direcţie de utilizare a biosenzorilor o constituie realizarea şi folosirea lor pentru măsurători *in vivo*; în ultimii ani au fost raportaţi o serie de electrozi implantabili pentru glucoză, dar puţini răspund cerinţelor unui senzor *in vivo* fiabil (tabel 1.6)

Tab. 1.6 Condiţiile pe care trebuie să le îndeplinească un sensor pentru măsurători *in vivo*

PARAMETRU	OBSERVAŢII
Biocompatibilitate	Reacţie tisulară minimă
Stabilitate în timp	Devierea liniei de bază 10% / zi
Calibrare	În fabrică sau într-un singur punct *in vitro*
Domeniu de răspuns linear	30 mM în cazul glucozei
Specificitate	Excluderea metaboliţilor interferenţi
Timp de răspuns	2 min
Sterilizare	Realizată prin iradiere
Rezistenţă mecanică şi fizică	Să nu-şi modifice caracteristicile în condiţiile folosirii lui în cadrul măsurătorilor *in vivo*

Rezultatele cercetărilor efectuate până în prezent sugerează că realizarea unor sensori de glucoză *in vivo* este foarte probabilă deşi sunt încă multe probleme de rezolvat (răspunsul senzorului la concentraţii mari de analit, colmatarea senzorului datorită altor constituenţi din sânge, infecţiile la nivelul interfeţei cu pielea).

1.5.4. APLICAŢIILE ENZIMELOR ÎN CONTROLUL POLUĂRII MEDIULUI

În perioada ultimilor 300 de ani. caracterizată printr-un progres tehnologic rapid omul a modificat în mod radical mediul înconjurător, fără a ţine cont de protecţia acestuia faţă de efectele dăunătoare cum este şi poluarea.

Marea majoritate a poluanţilor sunt biodegradabili, prezentând efecte dăunătore pe perioade scurte de timp, până când sunt distruşi de alte componente ale mediului. De

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

exemplu resturile menajere lichide deversate în mare devin eventual ne-dăunătoare datorită bacteriilor sau a altor microorganisme. Cu toate acestea, unii poluanţi îşi păstrează caracteristicile dăunătore pe o perioadă mare de timp ei ridicând probleme de mediu grave serioase datorită pericolului acumulării lor în lanţul trofic natural. Plumbul şi mercurul sunt recunoscuţi ca poluanţi persistenţi şi care se acumulează la fel cum sunt şi bifenolii policloruraţi (PCB). Controlul şi monitorizarea mediului are în vedere în primul rând detectarea şi evaluarea poluanţilor temporari şi persistenţi astfel încât efectele toxice ale acestora să poată fi cuantificate, putând fi realizate procedee de reducere a poluanţilor din mediu.

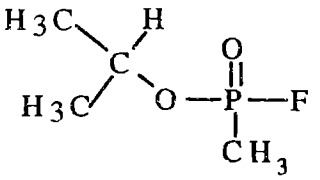
Enzimele sunt din ce în ce mai utilizate în analiza mediului datorită în primul rând a faptului că majoritatea poluanţilor au efect inhibitor asupra enzimelor. Multe dintre insecticidele organice sunt realizate în scopul omorârii insectelor prin inhibarea respiraţiei celulare şi sintezei de ATP. Alţi compuşi, în special compuşii organici cloruraţi cum este DDT acţionează asupra sistemului nervos. Astfel, detecţia inhibiţiei enzimatice reprezintă o metodă de monitorizare a poluanţilor din mediu. Această metodă depinde de reacţia enzimei (E) cu un inhibitor (I), reacţie în urma căreia poate rezulta un complex catalitic inactiv.

$$E + S \Leftrightarrow ES \Leftrightarrow E + P$$

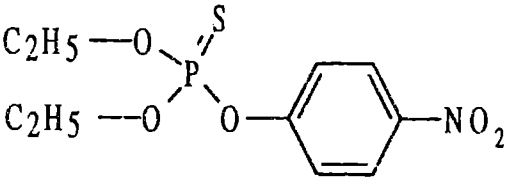
$$E + I \Leftrightarrow EI \not\Leftrightarrow E + P$$

Deoarece numărul de molecule de enzimă active scad transformarea substratului în produs prezintă o scădere corespunzătoare.

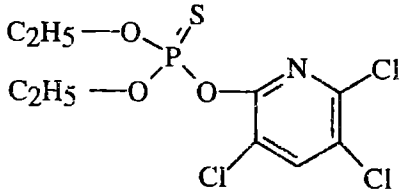
O enzimă des utilizată în astfel de studii este colinesteraza. Enzima este inhibată de un număr mare de compuşi organici incluzând multe insecticide şi câteva gaze toxice de luptă (figura 1.12)



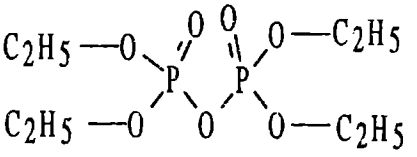
SARIN(GAZ TOXIC)



PARATHION (INSECTICID)



DURSBAN (INSECTICID)



TETRAETHYLPYROPHOSPHATE (TEPP), (INSECTICID)

Fig. 1.12 Inhibitori ai colinesterazei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În prezent, există o serie de biosenzori comercializaţi pentru monitorizarea probelor de aer şi apă. Enzima este imobilizată într-o matrice de gel şi depusă pe un strat adecvat de poliuretan, substratul enzimei fiind iodura de butiriltiocolină. În timpul unei determinări preparatul de enzimă este introdus în soluţia unui flux care conţine substratul, care este rapid hidrolizat de către enzimă rezultând produşii de reacţie corespunzători:

$$\text{butiriltiocolin-iodura} \xrightarrow{\text{colinesteraza}} \text{tiocolin-iodura} + \text{acidul butiric}$$

Stratul enzimatic este plasat între anodul şi catodul unui electrod potenţiometric utilizat drept traductor fizic. Tiocolin-iodura se oxidează la anod generând un potenţial de aproximativ 250 mV. Deci, în absenţa inhibitorului se înregistrează un potenţial de aproximativ 250 mV. Proba de analizat este ulterior introdusă în fluxul conţinând substratul. Dacă proba conţine un inhibitor al colinesterazei, activitatea enzimei va scădea. Concentraţia de tiocolin-iodură va scădea iar potenţialul electrodului creşte la aproximativ 500 MV. Această modificare a potenţialului poate fi corlată cu concentraţia inhibitorului enzimatic prezent în probă. Metoda este rapidă şi sensibilă putând fi determinate cantităţi de ordinul micro-gramelor de insecticid. Prin intermediul ei nu pot fi determinaţi şi alţi poluanţi care nu inhibă activitatea enzimei. Sistemul poate fi uşor adaptat pentru monitorizarea probelor de aer şi apă.

Au fost realizate de asemenea şi o serie de metode de determinare a contaminării solului datorată lichidelor menajere poluante.

Totodată sistemele enzimatice au fost utilizate pentru detecţia altor poluanţi cum sunt: fenolii, fenoxi-acizii de ex. erbicidul 2,4-D (acidul 2,4-diclorofenoxiacetic), a acidului nitrilotriacetic (component al unor detergenţi) şi nu în ultimul rând a unor metale grele cum ar fi cuprul, zincul şi plumbul.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2. ELEMENTE DE CINETICĂ ENZIMATICĂ

Mulţi ani experienţele de cinetică enzimatică au adus dovezi asupra existenţei complexului enzimă substrat ca un intermediar în reacţiile catalizate enzimatic.

Cinetica enzimatică prezintă trei aplicaţii de bază în studiul unei enzime şi anume: determinarea enzimei, efectul variabilelor şi în studii asupra mecanismului de reacţie.
Principiile din cadrul catalizei ne-enzimatice (chimice) se aplică şi în cazul catalizatorilor enzimatici atâta timp cât se ţine seama de faptul că enzima este supusă denaturării.

Concentraţia unui substrat care ia parte la o reacţie enzimatică poate fi determinată în două moduri:

- prin măsurarea modificării totale care se realizează prin analiză fizică, chimică sau enzimatică a substratului nereacţionat sau a produsului de reacţie format;
- din viteza reacţiei enzimatice, care depinde de concentraţia enzimei, substratului, activatorului sau inhibitorului;

Dat fiind faptul că enzima este un catalizator, ea afectând viteza şi nu echilibrul reacţiei, activitatea enzimelor trebuie determinată printr-o metodă cinetică. Activatorii şi inhibitorii, care afectează capacitatea catalitică a enzimei, şi deci viteza reacţiei enzimatice, pot fi determinaţi deasemenea numai prin metode cinetice.

În cinetica enzimatică se aplică în mod obişnuit condiţiile de reacţie de pseudo-ordinul unu, cu deosebirea că factorul limitativ de viteză este enzima (catalizatorul) şi nu substratul.

Pentru a trata pe scurt principiile determinărilor enzimatice prin metoda cinetică de analiză, se consideră ca un caz simplificat, conversia catalizată enzimatic a substratului S în produsul de reacţie P; în cele ce urmează se presupune că în timpul reacţiei catalitice (2.1):

$$S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\Leftrightarrow}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P \qquad (2.1)$$

- substratul (S) este complexat cu enzima (E);
- echilibrul tinde către formarea produsului de reacţie (P);
- etapa cea mai lentă (limitativă de viteză) este conversia complexului ES în P şi E, enzima fiind refolosită.

Dacă substratul se află într-un exces suficient de mare, comparativ cu enzima, imediat după amestecarea enzimei cu substratul, concentraţia enzimei tinde către zero (figura 2.1), ceea ce înseamnă că enzima se află aproape toată sub forma compexului ES şi rămâne astfel până aproape de sfârşitul reacţiei. Condiţiile de reacţie de acest tip, se numesc condiţiile stării staţionare (în condiţiile stării staţionare, concentraţia de enzimă, nu este esenţial să fie aproximativ egală cu zero). Figura 2.1 redă un caz limită al stării staţionare în care substratul saturează enzima.

În cazul reacţiei bimoleculare (2.1) se mai consideră şi următoarele ipoteze:

- substratul reacţionează cu enzima un timp finit pentru a forma complexul ES;
- complexul ES poate disocia fie pentru a forma $E + S$, sau poate reacţiona pentru a forma E+P;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- pe parcursul reacţiei substratul reacţionează continuu cu enzima pentru a forma complexul ES;
- în formarea produsului de reacţie există o perioadă de "lag" (mult exagerată în figură), premergătoare realizării stării staţionare.

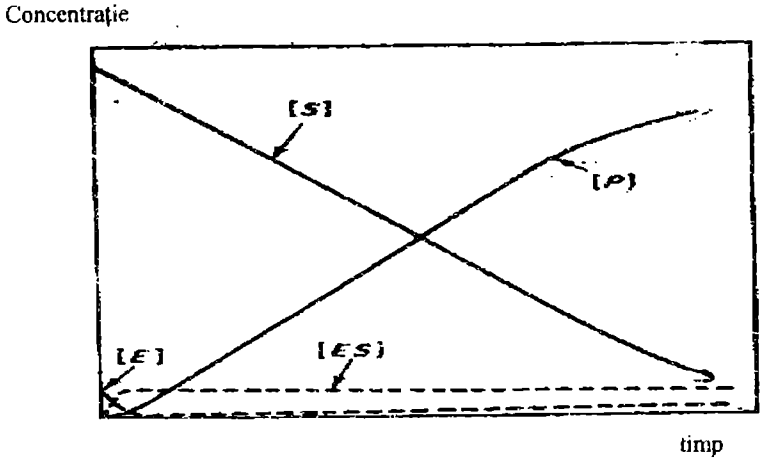


Fig. 2.1. Modificări în concentraţia reactanţilor pe parcursul unei reacţii enzimatice ipotetice care presupune transformarea ireversibilă a substratului (S) în produsul de reacţie (P) prin intermediul complexului enzimă-substrat (ES) [4].

Reacţia (2.1) poate fi utilizată ca un caz simplificat pentru a explica principiile determinărilor enzimelor şi a efectelor concentraţiilor de substrat, inhibitor şi activator.

2.1. ECUAŢIA MICHAELIS-MENTEN

Deoarece atât viteza cât şi specificitatea reacţiilor catalizate enzimatic depind de formarea unui complex specific ES, prima şi cea mai importantă contribuţie a cineticii enzimatice a fost descoperirea complexului enzimă-substrat, numit şi *complex Michaelis-Menten*, de a cărui formare depind atât specificitatea, cât şi viteza reacţiei.

Michaelis şi Menten au efectuat experienţe asupra invertazei, măsurând vitezele iniţiale ale reacţiei la diferite concentraţii de substrat. Plecând de la mecanismul de reacţie (2.1), unde ES reprezintă complexul intermediar sau Michaelis-Menten, ei au propus prima etapă de reacţie reversibilă şi suficient de rapidă pentru a putea fi reprezentată printr-o constantă de echilibru (disociere):

$$K_d = \frac{[E][S]}{[ES]} \qquad (2.2)$$

K_d = constanta de disociere

Concentraţiile instantanee ale enzimei libere şi ale substratului nu pot fi măsurate direct şi de aceea trebuie exprimate în termenii concentraţiei iniţial măsurate şi anume:

$$[E_0] = [E] + [ES] \qquad (2.3)$$

şi

$$[S_0] = [S] + [ES] \qquad (2.4)$$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Deoarece concentrația inițială de substrat este mare se poate aproxima faptul că $[S] \approx [S_0]$. De aceea, în toate calculele și ecuațiile care vor urma se poate folosii fără a greși concentrația inițială de substrat $[S_0]$ în locul concentrație de substrat [S], la un timp t oarecare

Din ecuația (2.3) se obține:

$$[E] = [E_0] - [ES] \tag{2.5}$$

care introdusă în relația (2.2) conduce la:

$$K_d = \frac{[S\ ]([E_0] - [ES])}{[ES]}$$

sau exprimând [ES]

$$[ES] = \frac{[E_0][S\ ]}{K_d + [S]} \tag{2.6}$$

Etapa a II-a de reacție este de ordinul întâi, caracterizată de constanta de viteză k_{+2} :

$$v_0 = k_{+2}[ES] \tag{2.7}$$

și ținând cont de ecuația (2.6) obținem:

$$v_0 = k_{+2}\frac{[E_0][S]}{k_d + [S\ ]} \tag{2.8}$$

Dacă echilibrul dintre enzimă, substrat și complexul enzimă-substrat este atins rapid, etapa limitativă de viteză va fi descompunerea complexului ES, și deci dacă $[S_0] >> [E_0]$, viteza de reacție va fi independentă de concentrația de substrat. În concluzie, odată cu creșterea concentrației de substrat, viteza va crește spre un maxim definit, cunoscut sub denumirea de viteză de saturație V_S figura (2.2).

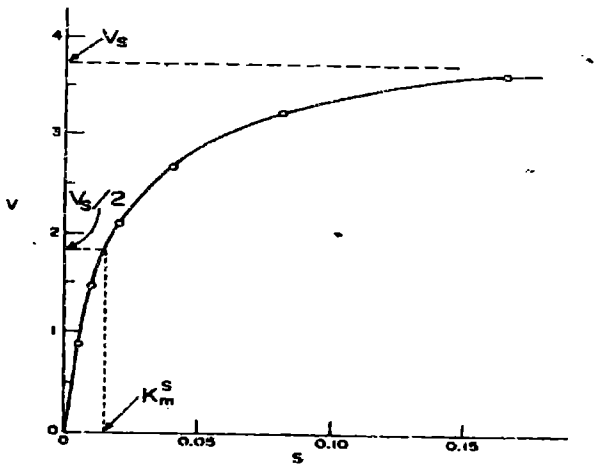


Fig.2.2 Variația vitezei de reacție funcție de concentrația de substrat.

Ipoteza echilibrului dintre complexul enzimă-substrat și reactanți, a fost criticată de Briggs și Haldane. În anul 1925 aceștia au introdus conceptul de stare staționară în cadrul

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

reacţiilor enzimatice şi au demonstrat ca neesenţial conceptul echilibrului propus de Michaelis şi Menten.

Înainte de a adaugă substratul la o soluţie enzimatică, toate moleculele de enzimă sunt libere. Când se adaugă substratul, enzima şi substratul se combină rapid, urmând o fază de tranziţie în care se acumulează complexul ES, până când se atinge nivelul de stare staţionară. Cu cât este mai mare concentraţia de substrat adăugată, cu atât va fi mai mare concentraţia iniţială a stării staţionare. Când toată enzima este sub forma complexului ES, orice altă creştere neglijabilă a concentraţiei de substrat, va duce la o creştere neglijabilă a concentraţiei complexului şi deci a vitezei de reacţie [5,6].

Tratarea stării staţionare se bazează pe ipoteza că în cursul unei reacţii concentraţia anumitor intermediari de reacţie, cum ar fi complexul ES, nu se modifică rapid. Conform acestei ipoteze rezultă că:

$$\frac{d[S]}{dt} \gg \frac{[ES]}{dt} \approx 0 \qquad (2.9)$$

Această ipoteză este valabilă pe tot parcursul reacţiei, cu excepţia perioadei iniţiale, înainte ca starea staţionară să fi fost atinsă şi de asemenea, cu excepţia perioadei finale a reacţiei când condiţia $[S_0] \gg [E_0]$ nu mai este valabilă. Briggs şi Haldane au argumentat că în orice alte momente ale reacţiei viteza netă de modificare a concentraţiei complexului ES este egală cu zero. În aceste condiţii ecuaţiile cinetice devin:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}[ES][S] - k_{-1}[ES] - k_{+2}[ES] \qquad (2.10)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_{+1}[E][S] + k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES] \qquad (2.11)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES] \qquad (2.12)$$

Din ecuaţia (2.10), se observă că viteza de modificare a complexului ES în timp trebuie să egaleze diferenţa dintre formarea lui în prima etapă caracterizată prin constanta de viteza k_{+1} şi desfacerea lui în produşi sau reactanţi caracterizată prin constantele k_{-1} şi k_{+2}. Dacă presupunem că:

$[S_0] \gg [E_0]$ se va stabili o situaţie staţionară în care concentraţia [ES] se modifică foarte încet comparativ cu [S] şi [P], adică:

$$\frac{d[ES]}{dt} \approx 0 \qquad (2.13)$$

La începutul reacţiei, substratul şi enzima reacţionează repede. Formarea complexului ES începe cu viteza $k_{+1}[E][S]$. Pe perioada fazei de tranziţie [ES] tinde către un nivel de stare staţionară adecvat concentraţiilor de enzimă şi substrat introduse iniţial, după care scade prin scăderea concentraţiei de substrat. În ipoteza că $[S_0] \gg [E_o]$, scăderea concentraţiei complexului enzimă-substrat datorată micşorării concentraţiei de substrat va fi relativ mică. Deci în cadrul fazei stării staţionare a reacţiei $d[ES]/dt \ll k_{+1}[S_0][E_o]$ adică mai mică decât viteza rapidă de formare a complexului ES de la începutul fazei de tranziţie. Ştiind că:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

$$[E_0]=[E]+[ES] \tag{2.14.}$$

din ecuaţiile (2.10) şi (2.14) se obţine:

$$k_{+1}[S]([E_0]-[ES])=(k_{-1}+k_{+2})[ES]$$

sau

$$k_{+1}[S][E_0]=(k_{+1}[S\ ]+k_{-1}+k_{+2})[ES] \tag{2.15}$$

Rezultă că:

$$[ES]=\frac{k_{+1}[S\ ][E_0]}{(k_{+2}+k_{-1})+k_{+1}[S]} \tag{2.16}$$

Ţinând cont de ecuaţiile (2.12) şi (2.16)

$$v_0=\frac{d[P]}{dt}=k_{+2}[ES]=k_{+2}\frac{k_{+1}[E_0][S]}{(k_{+2}+k_{-1})+k_{+1}[S]}$$

sau împărţind totul cu k_{+1}:

$$v_0=k_{+2}\frac{[E_0][S]}{[K_m]+[S]} \tag{2.17}$$

unde:

$$K_m=\frac{k_{+2}+k_{-1}}{k_{+1}} \tag{2.18}$$

În relaţiile (2.17) şi (2.18) s-au notat prin:

$[E_0]$ – concentraţia iniţială de enzimă;

$[S_0]$ – concentraţia iniţială de substrat;

K_m - constanta Michaelis-Menten;

k_{+1}, k_{-1}, k_{+2} - constantele cinetice respective.

Ecuaţia (2.17) este deci aceeaşi ca şi ecuaţia Michaelis-Menten cu excepţia faptului că în locul lui K_d apare K_m. Dacă $k_{-1}>>k_{+2}$ atunci $K_m \cong K_d$

La concentraţii mari de substrat, $[S]>>[K_m]$ din ecuaţia (2.17) se obţine:

$$v=k_{+2}[E_0] \tag{2.19}$$

În acest caz, viteza atinge o valoare maximă:

$$V_{max}=k_{+2}[E_0] \tag{2.20}$$

şi deci:

$$v_0=\frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]} \tag{2.21}$$

unde: K_m = constanta Michaelis-Menten

V_{max} = viteza maximă

Cei doi parametrii cinetici K_m şi V_{max} caracterizează enzima care catalizează reacţia. Ecuaţia (2.21) este ecuaţia de viteză a stării staţionare pentru o reacţie omogenă care implică un catalizator refolosibil. Ea reprezintă ecuaţia fundamentală a cineticii enzimatice şi este denumită ecuaţia Michaelis-Menten.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Această ecuație se aplică și la mecanisme mult mai complexe decât mecanismul Michaelis-Menten, dar în aceste cazuri expresiile constantelor V_{max} și K_m au definiții mai complexe.

Ecuația (2.21) descrie o hiperbolă rectangulară cu asimtotele la $[S_0] = -K_m$ și $v_0 = V_{max}$. Centrul acestei secțiuni conice este în punctul $(-K_m, V_{max})$. Porțiunea din curbă relevantă pentru cinetica enzimatică este secțiunea din hiperbolă care prezintă valori pozitive ale concentrației de substrat (a se vedea sectiunea 2.3). Forma grafică a ecuației (2.21) este redată în figura 2.3, iar proprietățile acesteia în tabelul 2.1 [7].

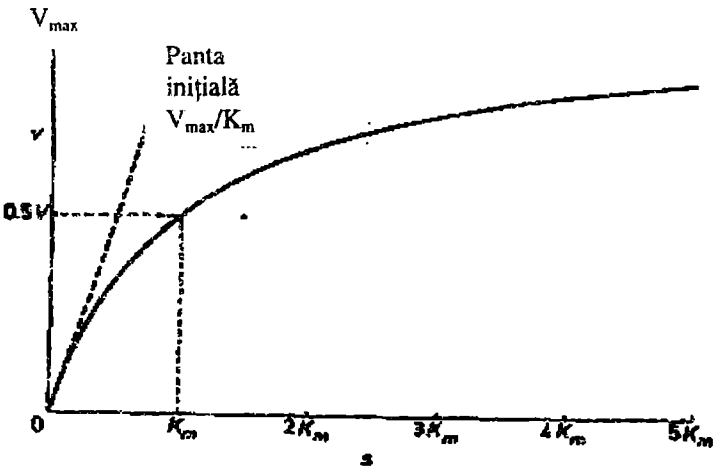


Fig. 2.3 Graficul vitezei inițiale de reacție funcție de concentrația de substrat pentru o reacție enzimatică care respectă ecuația Michaelis-Menten.

Tab. 2.1 Proprietățile ecuației Michaelis-Menten

[S]	v_0
1000 K_m	0,999
100 K_m	0,990
10 K_m	0,910
3 K_m	0,750
K_m	0,5
0,33 K_m	0,25
0,10 K_m	0,091
0,01 K_m	0,010

2.2. SEMNIFICAȚIA CINETICĂ ȘI ANALITICĂ A PARAMETRILOR K_m ȘI V_{max}

Constantele cinetice K_m și V_{max} reprezintă doi parametrii foarte importanți și utili pentru descrierea caracteristicilor unei enzime care catalizează o reacție chimică; în practică nu se poate afirma faptul că parametrul K_m se exprimă în mod simplu prin ecuația (2.18) sau că $V_{max.} = k_{+2}[E_0]$. $V_{max.}$ nu este o proprietate fundamentală a unei enzime, pentru că depinde de concentrația de inițială de enzimă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru ecuaţia cinetică (2.21) se pot introduce o serie de ipoteze simplificatoare, care prezintă un rol important în cadrul studiilor cinetice, cât şi în cadrul determinărilor enzimatice.

Una dintre aceste ipoteze este următoarea:

- dacă [S] << K_m, din ecuaţia (2.21) rezultă că viteza iniţială depinde atât de concentraţia de substrat, cât şi de cea de enzimă:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m} \qquad (2.22)$$

După cum se observă din relaţia (2.22), la concentraţii fixe de enzimă viteza iniţială creşte direct proporţional cu concentraţia de substrat până când, la adăugarea unui mic exces de substrat, viteza de reacţie rămâne constantă. Raportul V_{max}/K_m poate fi privit ca o constantă cinetică şi deci reacţia este de ordinul unu în raport cu substratul. Deci, din punct de vedere analitic, pentru determinarea substratelor, reacţia trebuie să fie de ordinul unu sau pseudo-ordinul unu în raport cu acesta; domeniul pentru care se obţine liniaritatea şi în care determinarea analitică a concentraţiei unui substrat poate fi realizată prin măsurarea vitezei iniţiale de reacţie se află la valori ale concentraţiei de substrat [S] < 0,1 K_m.

- dacă [S] = K_m din ecuaţia (2.21) rezultă că

$$v_0 = \frac{V_{max}}{2} \qquad (2.23)$$

Din ecuaţia (2.23) se poate da o definiţie simplă pentru constanta Michaelis-Menten şi anume: ea reprezintă acea concentraţie de substrat pentru care se obţine jumătate din viteza maximă.

- dacă concentraţia de substrat este cuprinsă între 0,1 K_m< [S] <10 K_m atunci reacţia este intermediară între ordinul zero şi unu în raport cu substratul.

- dacă [S] >>K_m tot din ecuaţia (2.21) se obţine pentru viteza iniţilă de reacţie:

$$v_0 = V_{max} \qquad (2.24)$$

În aceste condiţii viteza de reacţie este de ordinul zero în raport cu substratul şi de ordinul întâi faţă de concentraţia de enzimă. Când concentraţia de [S] > 100 K_m, deviaţia de la cinetica de ordinul zero este mai mică decât 1% rezultând că v_0 = 0,99 V_{max}; chiar când [S] > 10 K_m, deviaţia de la cinetica de ordinul zero este de numai 9%, rezultând că v_0 = 0,91 V_{max}. În realitate, viteza iniţială v_0 se apropie foarte greu de viteza maximă V_{max}, chiar în condiţiile în care concentraţia de substrat este foarte mare ([S] = 10 K_m). De aceea, V_{max} nu poate fi determinată prin măsurători directe, însă ea poate fi estimată din valorile vitezei iniţiale, obţinute la valori ale concentraţiei de substrat de subsaturare.

Presupunând că se cunoaşte concentraţia enzimei, se poate defini mărimea k_{cat} denumită "*constanta catalitică*" sau "*număr de turnover*", ca fiind:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_0]} \qquad (2.25)$$

În cazul mecanismului Michaelis-Menten, $k_{cat} = k_{+2}$, dar în general se preferă notaţia k_{cat}.

Valoarea vitezei maxime se corelează cu cantitatea de enzimă folosită, iar K_m reprezintă o măsură a activităţii acesteia. Enzimele care prezintă valori mari de K_m au o activitate enzimatică mică fiind mai puţin active.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.3. NATURA HIPERBOLICĂ A ECUAȚIEI MICHAELIS-MENTEN

Graficul vitezei de reacție în funcție de concentrația de substrat, conform ecuației Michaelis-Menten, este deseori descris ca o hiperbolă rectangulară. În matematică, hipebolele prezintă două arcuri, iar prin reprezentarea ecuației Michaelis-Menten rezultă numai unul; de asemenea, chiar exprimarea matematică a ecuației Michaelis –Menten (2.21) pare să aibă prea puțin în comun cu expresia obișnuită a unei hiperbole rectangulare cu axele x și y ca asimptote

$$x \cdot y = a \qquad (2.26)$$

și chiar mai puțin cu expresia unei hiperbole rectangulare cu asimptotele înclinate la 45^0 față de axele x și y:

$$x^2 - y^2 = a^2 \qquad (2.27)$$

Efectuând însă substituția în ecuația (2.21.):

$$x = [S] + K_m \text{ sau } x = [S] - (-K_m)$$

$$y = v - V_{max} \qquad (2.28)$$

$$a = -V_{max}K_m$$

și introducând în relația (2.26), se va obține:

$$([S] + K_m)(v - V_{max}) = -V_{max}K_m \qquad (2.29)$$

ceea ce reprezintă o formă rearanjată a ecuației Michaelis-Menten.

Deoarece asimptotele hiperbolei (2.26) sunt x = 0 si y = 0, rezultă că din definiția lui x și y din ecuația (2.28), asimptotele graficului viteză funcție de concentrația de substrat sunt :

$[S] = -K_m$ și $v = V_{max}$

Pentru că asimptota verticală apare la o valoare negativă a concentrației de substrat, este clar de ce curba pare să aibă o singură parte; întreaga parte negativă și o parte din cea pozitivă apar într-o regiune a graficului imposibilă din punct de vedere fizic, deci nu pot fi observate.

Aceste concluzii sunt redate în figura 2.4, care redă mai mult din curbă decât poate fi în mod normal observată. Acest fapt are o importanță practică atunci când se estimează valorile K_m și V_{max} din studiul influenței concentrației de substrat asupra vitezei de reacție v_0, estimându-se practic forma întregii hiperbole din numai câteva observații efectuate de-a lungul unui arc scurt.

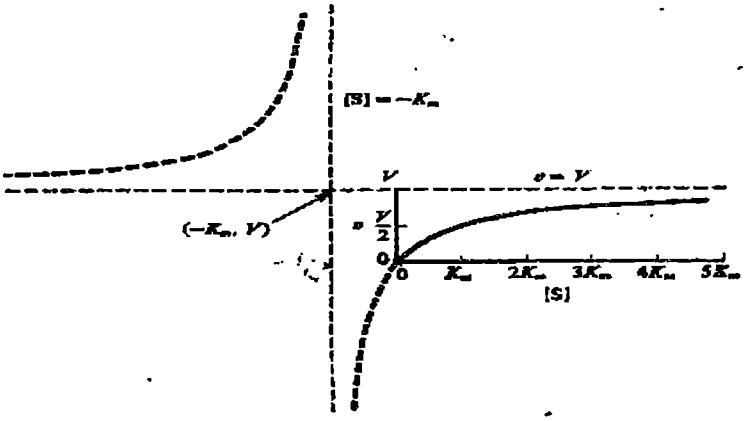


Fig. 2.4 Graficul vitezei inițiale v_0 în funcție de concentrația de substrat [S], pentru o reacție care se supune ecuației Michaelis-Menten redând natura hiperbolică a ecuației [5].

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Figura 2.4 ilustrează o proprietate a curbei, corelată cu faptul că orice dreaptă care trece prin punctul de intersecţie al asimptotelor, taie axele în două puncte, care împreună, corespund coordonatelor unui punct de pe curbă. Această proprietate formează baza graficului linear direct, care este totuşi trasat ca o reflecţie a figurii (2.4), privind axa verticală, deoarece este tratat ca un grafic viteză funcţie de constanta K_m, mai degrabă decât o trasare a unui grafic viteză funcţie de concentratia de substrat.

2.4 REPREZENTĂRI GRAFICE ALE ECUAŢIEI MICHAELIS-MENTEN. DETERMINAREA PARAMETRILOR CINETICI K_M ŞI V_{MAX}.

Reacţia enzimatică este iniţiată odată cu amestecarea enzimei cu substratul; pe măsură ce reacţia progresează, concentraţiile de substrat şi produs se vor modifica, ca de altfel şi viteza. Curba progresivă tipică, rezultată prin trasarea graficului produs de reacţie format în funcţie de timp, porneşte de obicei cu o pantă constantă, care, în mod gradual, va scădea pe măsură ce modificările în concentraţiile de substrat şi de produs vor fi mai mari. În cinetica enzimatică există două metode pentru evaluarea relaţiei dintre viteza de reacţie v_0 şi concentraţia de substrat, din curbe progresive de această formă.

2.4.1. METODA VITEZEI INIŢIALE

Deoarece concentraţiile de substrat şi a altor liganzi sunt în mod cert prezente la timpul t=0, determinarea vitezei de reacţie iniţială are avantajul că dă naştere la erori mici de-a lungul scării de concentraţie. Estimarea vitezei iniţiale necesită extrapolarea curbei progresive la timpul t=0, prin metode vizuale sau computerizate (fig. 2.5).

a. Metoda vizuală

Trasându-se tangenta în origine la curba progresivă se obţine panta tangentei la curbă, la timpul zero, care corespunde vitezei iniţiale a stării staţionare.

b. Estimarea computerizată

Din studii experimentale se pot obţine o serie de valori ale concentraţiilor produşilor de reacţie la timpi succesivi, iar seriile de puncte (P_1, t_1), (P_2, t_2), ..., (P_i, t_i) ... pot fi introduse într-o formulă de extrapolare, de ex. o serie de puteri în timp O serie simplă este:

$$P= a_0+ a_1t + a_2t^2+ a_3t^3+ \ldots \qquad (2.30)$$

Introducând punctele obţinute în seria de puteri, se pot determina coeficienţii a_0, a_1, a_2, etc. Panta iniţială este dată de coeficientul a_1, deoarece:

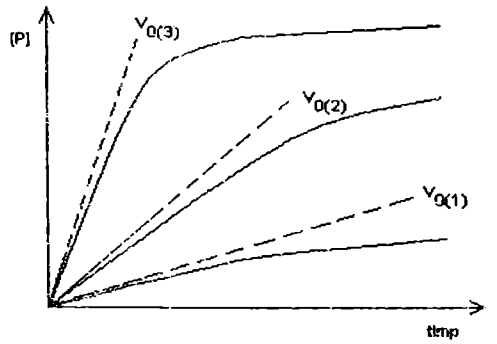
$$\frac{d[P]}{d[t]} = a_1 + 2a_2t + 3a_3t^2 + \ldots$$

$$= a_1 \qquad \text{când } t=0 \qquad (2.31)$$

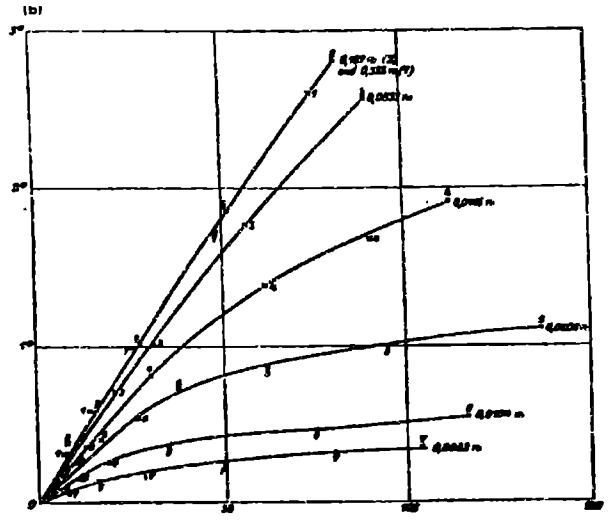
Pentru curbele progresive care au o formă regulată şi sunt înregistrate continuu, ambele tipuri de procedee conduc, în general, la rezultate similare. În general, procedeele computerizate sunt mult mai puţin susceptibile erorilor vizuale sistematice. În ambele cazuri recizia este îmbunătăţită dacă se utilizează metode sensibile de determinare, prin intermediul

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cărora se urmărește numai porțiunea inițială a curbei progresive (înaintea apariției unor modificări mari de concentrație).



(a)



(b)

Fig.2.5 Curba progresivă. (a) Curba progresivă rezultată prin trasarea graficului concentrație de produs în funcție de timp. Viteza inițială poate fi determinată fie prin trasarea tangentei la curbă la t=0 sau (b) curba progresivă obținută pentru o serie de concentrații de substrat (sucroză) de la 0,0052 M la 0,333 M [6]

Prin determinarea vitezei inițiale v_0 pentru o serie de amestecuri de reacție conținând diferite concentrații de substrat, se poate trasa graficul viteză inițială în funcție de concentrația de substrat. Ecuația de viteză a stării staționare (2.21) indică faptul că graficul reprezintă o hiperbolă rectangulară, generată de cei doi parametrii numerici: V_{max} și K_m. După cum s-a demonstrat mai sus forma acestei hiperbole devine evidentă dacă se evaluează viteza pentru trei concentrații limită de substrat:

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad \begin{array}{ll} [S]=0 & \rightarrow v_0=0 \\ [S]=Km & \rightarrow v_0=V_{max}/2 \\ [S]>>Km & \rightarrow v_0 \sim V_{max} \end{array} \qquad (2.32)$$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Viteza este zero când concentrația de substrat este zero, se apropie de V_{max} când concentrația de substrat este foarte mare; viteza este egală, cu $V_{max}/2$ când concentrația de substrat este egală cu constanta Michaelis (K_m). Figura 2.5 b redă vitezele de hidroliză ale sucrozei de către invertază, ilustrând totodată tipul de comportare prezentat mai sus.

După cum s-a demonstrat, viteza inițială este funcție de concentrațiile inițiale de enzimă și substrat (a se vedea ecuația 2.21). La o concentrație fixă de enzimă, viteza crește cu concentrația de substrat până este atins un nivel de concentrație de substrat (exces), care limitează viteza reacției (figura 2.3), după care orice altă adăugare de substrat nu mai duce la o creștere a vitezei.

Metoda cea mai evidentă pentru reprezentarea ecuației (2.21) este aceea de a trasa graficul viteză inițială (v_0) în funcție de concentrația de substrat, din care rezultă o hiperbolă rectangulară cu asimptotele la $v_0=V_{max}$ și $[S] = -K_m$ (figurile 2.3 și 2.4).

Acest grafic prezintă unele dezavantaje legate de faptul că este greu de folosit în practică, deoarece este dificil de trasat o hiperbolă rectangulară, existând totodată o tendință puternică ca asimptotele să fie trasate prea aproape de curbă ceea ce face dificilă estimarea corectă a asimptotelor (cu toate că la concentrații mari de substrat viteza v_0 se apropie de V_{max}); este deci foarte greu să se estimeze valoarea exactă a V_{max} din curba hiperbolică. Dacă V_{max} este estimată greșit, rezultă că și $V_{max}/2$ și implicit K_m vor fi estimate greșit; un alt dezavantaj este legat de faptul că este dificilă găsirea unei relații între o familie de hiperbole, fiind deasemenea greu de a se stabili deviațiile de la curba probabilă.

Deci, ecuația unei hiperbole rectangulare nu reprezintă o formă convenabilă pentru evaluarea constantelor cinetice V_{max} și K_m. Aceste dezavantaje au fost recunoscute de Michaelis și Menten, care în loc să reprezinte viteza inițială (v_0) în funcție de concentrația de substrat ([S]) au reprezentat v_0 în funcție de log[S]. Acest grafic dă naștere unei curbe simetrice în formă de S care are panta maximă când $[S]=K_m$ (figura 2.6).

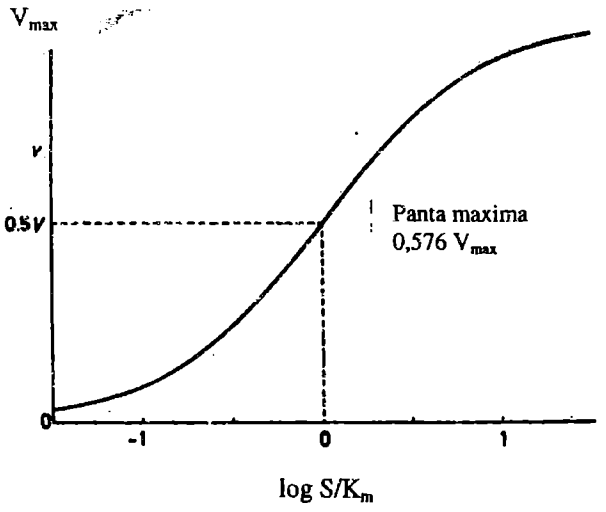


Fig.2.6 Determinarea V_{max} și K_m prin metoda lui Michaelis --Menten. Graficul este aproximativ liniar pe un domeniu apreciabil de viteze și astfel panta maximă poate fi estimată ușor [6].

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Diferențiind ecuația (2.21) rezultă:

$$\frac{dv_0}{d\ln[S]} = \frac{K_m \cdot V_{max} \cdot [S]}{(K_m + [S])^2} \Leftrightarrow$$
$$\frac{dv_0}{d\log[S]} = 2{,}303\frac{K_m \cdot V_{max} \cdot [S]}{(K_m + [S])^2} \qquad (2.33)$$

Valoarea maximă a pantei rezultă atunci când [S]=K_m și este egală cu $\frac{2{,}303V_{max}}{4} = 0{,}576V_{max}$. Deci, V_{max} poate fi determinată astfel: $V_{max} = \frac{panta \cdot \max ima}{0{,}576}$.

Michaelis-Menten au estimat parametrul K_m ca fiind valoarea concentrației de substrat pentru care viteza a fost egală cu $v_0=V_{max}/2$.

Determinarea parametrului cinetic K_m în acest mod este mult mai precisă decât estimarea punctului în care apare panta maximă. Acest grafic nu mai este folosit azi, dar prezintă un interes istoric putând fi folosit pentru a reda saturarea enzimelor care prezintă mai multe centre de legare.

Începând cu Lineweaver și Burk, mulți cercetători au preferat să retranscrie ecuația lui Michaelis-Menten într-o formă care să permită trasarea rezultatelor sub forma unui grafic liniar. Segal (1985), a descris originea istorică a graficelor lui Lineweaver și Burk (1934), Eadie (1942) și Hanes (1932), care rezultă din expresia hiperbolică (2.21) astfel [5]:

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

se trasează graficul:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}}\left(\frac{1}{[S]}\right); \frac{1}{v_0} \rightarrow f\left(\frac{1}{[S]}\right) \quad (2.34)$$

Lineweaver și Burk (1934)

$$v_0 = V_{max} - K_m\frac{v_0}{[S]}; v_0 \rightarrow f\left(\frac{v_0}{[S]}\right) \quad (2.35)$$

Wolf (1932)

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{[S]}{V_{max}}; \frac{[S]}{v_0} \rightarrow f([S]) \quad (2.36)$$

Hanes (1932)

Prin intermediul ecuației (2.34) $\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}}\left(\frac{1}{[S]}\right)$ se poate obține un grafic liniar $\frac{1}{v_0} \rightarrow f\left(\frac{1}{[S]}\right)$, având panta $= \frac{K_m}{V_{max}}$ și intersecția pe ordonată $1/V_{max}$ (figura 2.7), iar pe abscisă $-1/K_m$.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

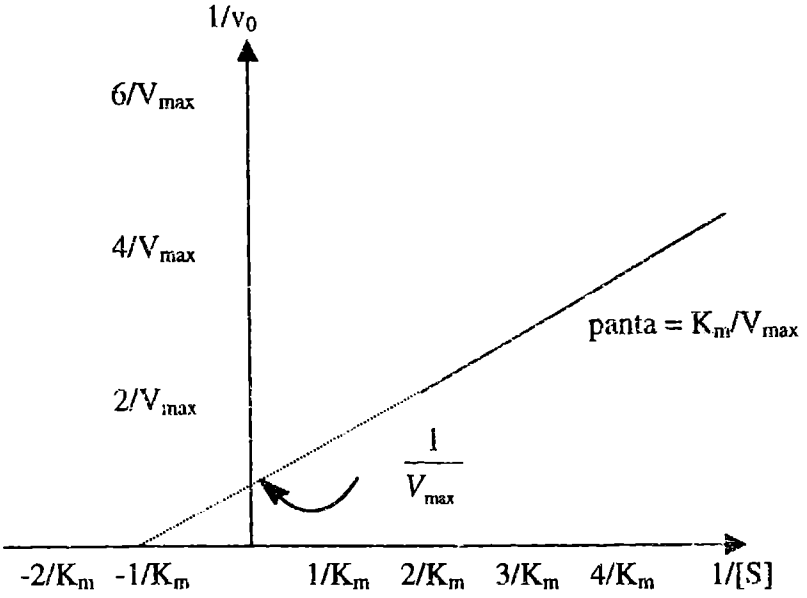


Fig. 2.7 Graficul schematic al datelor de cinetică enzimatică folosind ecuaţia Lineweaver-Burk (2.34).

O analiză, prin simpla regresie liniară a celor mai mici pătrate, a datelor în această formă nu este recomandabilă pentru că inversarea influenţează mărimea erorilor. Datele pot fi totuşi folosite în această formă dacă ele sunt mediate adecvat.

Ţinând cont de ecuaţia (2.36) se poate obţine un grafic $\frac{[S]}{v_0} \rightarrow f([S])$, liniar având panta egală cu $1/V_{max}$ şi intersecţiile K_m/V_{max} cu axa $[S]/v_0$ şi $-K_m$ cu axa [S] (figura 2.8).

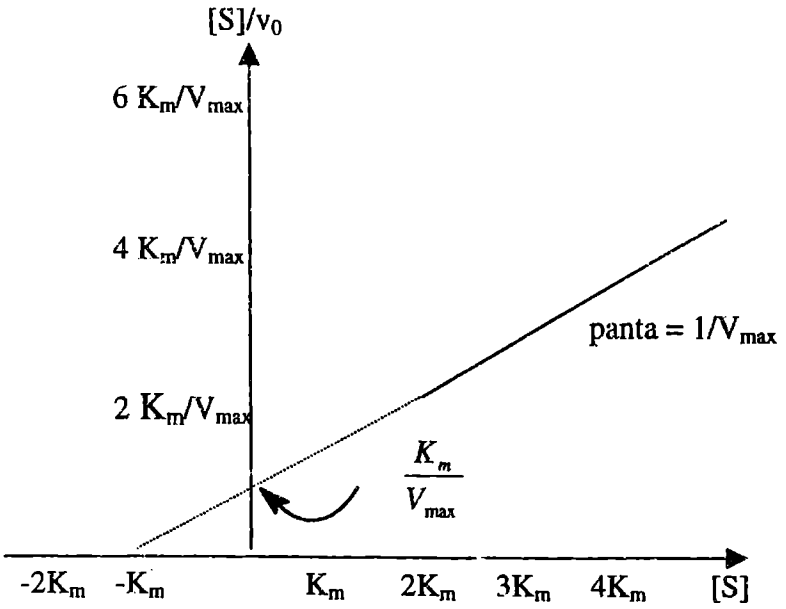


Fig.2.8. Graficul schematic al datelor de cinetică enzimatică folosind ecuaţia Hanes (2.36).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Ecuația (2.35) conduce la obținerea graficului $v_0 \rightarrow f\left(\frac{v_0}{[S]}\right)$, reprezentând o dreaptă de pantă $-K_m$ și intersecție pe ordonată V_{max} și V_{max}/K_m pe abscisă (figura 2.9).

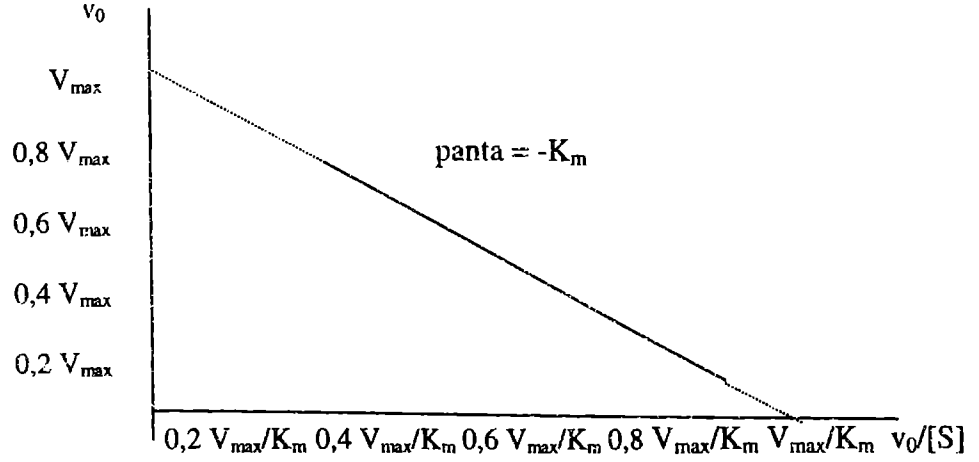


Fig. 2.9 Graficul schematic al datelor de cinetică enzimatică folosind ecuația Wolf (2.35).

Ecuația (2.21) poate fi aranjată și sub forma propusă de **Eadie și Hofstee** (1952):

$$\frac{v_0}{[S]} = \frac{V_{max}}{K_m} - \frac{v_0}{K_m} \qquad (2.37)$$

Prin intermediul ecuației (2.37) se poate trasa graficul $\frac{v_0}{[S]} \rightarrow f(v_0)$, care reprezintă o dreaptă cu panta $-1/K_m$ și intersecția pe ordonată $\frac{V_{max}}{K_m}$, iar pe abscisă V_{max} (figura 2.10):

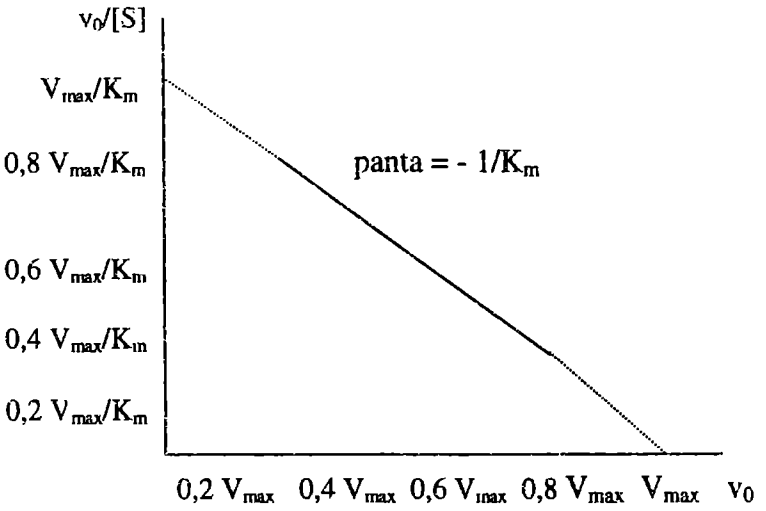


Fig. 2.10 Reprezentarea schematică a datelor de cinetică enzimatică bazată pe ecuația Eadie-Hofstee (2.37).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Ecuaţiile (2.35) şi (2.37) conduc la erori mari în determinarea parametrilor cinetici, deoarece viteza iniţială apare în ambii membri ai ecuaţiilor, determinarea acesteia conducând la erori mai mari decât în cazul măsurării concentraţiei de substrat. În scopul determinării parametrilor cinetici, V_{max} şi K_m, se recomandă un domeniu de concentraţii de substrat cuprins între 0,2 şi 5 K_m.

Avantajele graficelor de mai sus constau în uşurinţa şi acurateţea unei reprezentări liniare comparativ cu aceea a unei hiperbole precum şi în estimarea simplă a pantei şi intersecţiilor dreptei.

Recent au fost luate în discuţie influenţele statistice inerente rezultate ca urmare a transformărilor liniare ale ecuaţiei Michaelis-Menten; din aceste studii au rezultat o serie de concluzii dintre care se faptul că: în scopuri ilustrative se poate folosi orice grafic, dar cel mai adesea în practică fiind utilizat graficul Lineweaver-Burk care este totodată şi cel mai puţin corect. Graficul Lineweaver-Burk prezintă deviaţii de la linearitate la concentraţii mici de substrat. Probleme similare apar si în condiţiile folosirii celorlalte două grafice (figurile 2.8 şi 2.9). Graficele din figurile 2.7, 2.8 şi 2.9 prezintă o serie de dezavantaje fiind considerate ca nesatisfăcătoare.

Graficul $v_0 \rightarrow f\left(\frac{v_0}{[S]}\right)$ prezintă dezavantajul că v_0- variabilă dependentă- apare în ambele coordonate. Din cele trei grafice, graficul $\frac{[S]}{v_0} \rightarrow f([S])$ este cel mai satisfăcător. Pentru estimarea parametrilor cinetici pot fi utilizate şi o serie de programe de calculator.

Eisenthal şi Cornish- Bowden (1974) [5], au descris o metodă complet diferită de a reprezenta grafic rezultatele cineticii enzimatice, ei denumind graficul folosit de ei "graficul liniar direct". Astfel, în locul scrierii ecuaţiei Michaelis-Menten sub forma ecuaţiei 2.21, care prezintă dependenţa vitezei iniţiale de concentraţia de substrat, ei au rearanjat expresia pentru a reda dependenţa vitezei maxime (V_{max}) de constanta MichaelisK_m:

$$V_{max} = v_0 + \frac{v_0}{[S]} K_m \qquad (2.38)$$

În acest caz, pentru orice valoare a vitezei iniţiale şi a concetraţiei de substrat se poate trasa un grafic al vitezei maxime (V_{max}) în funcţie de K_m sub forma unei drepte care are panta egală cu v_0/S şi cu intersecţiile: -[S] pe axa K_m şi v_0 pe axa V_{max}. Dacă se trasează mai multe drepte de acelaşi fel, pentru mai multe determinări, acestea se vor intersecta într-un punct comun ale cărui coordonate dau numai valorile V_{max} şi K_m (figura 2.11). În cazul determinărilor reale, punctul de intersecţie este prost definit (nu ca în figura 2.11), datorită erorilor experimentale; punctul cel mai corect este uşor de găsit el fiind acela în care dreptele se strâng cel mai aproape unele de altele. De asemenea, determinările greşite sunt uşor de recunoscut într-un astfel de grafic, deoarece ele dau naştere la drepte care diferă mult una de alta. Avantajul principal al acestui tip de grafic este acela că nu necesită nici un fel de calcul.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

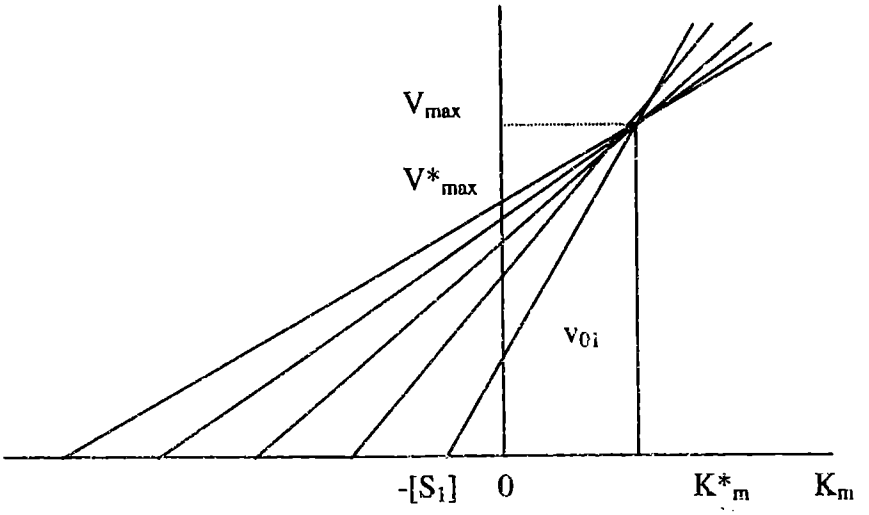


Fig. 2.11 Graficul liniar direct bazat pe ecuaţia (2.38). Fiecare linie reprezintă o determinare având intersecţiile: $-[S]$ pe axa K_m şi respectiv v_0 pe axa V_{max}. Punctul de intersecţie dă coordonatele cele mai bune a lui K^*_m şi V^*_{max}.

2.4.2. METODA VITEZEI INTEGRATE

O ecuaţie cinetică poate fi scrisă în două forme diferite: ca o expresie care să indice modificarea concentraţiei unui reactant în timp sau, ca una care să redea variaţia vitezei de reacţie în funcţie de concentraţia reactanţilor.

Enzimologii iau în considerare a doua posibilitate, în timp ce chimiştii pe prima; chimiştii preferă totodată ecuaţiile de viteză integrate, acestea având avantajul că reprezintă ceea ce se determină la moment dat.

Michaelis şi Menten (1913) au abordat problema studierii enzimelor prin măsurarea vitezelor iniţiale de reacţie situaţie în care se elimină erorile introduse de inhibiţia prin produşii de reacţie şi a scăderii concentraţiei de substrat sub nivelul necesar saturării enzimei cu substrat. Iniţial biochimiştii nu au încercat să aplice ecuaţiile de viteză integrate, chiar atunci când acestea erau adecvate studiilor lor.

Determinările vitezelor iniţiale sunt adecvate în etapele preliminare ale unui studiu de cinetică enzimatică, când problema principală este aceea de a găsi şi ecuaţia adecvată şi valorile aproximative ale parametrilor cinetici. În aceste studii este indicat să se înlăture efectele produşilor de reacţie sau să fie luate în considerare în mod controlat. Totuşi, odată încheiat acest studiu preliminar, este bine să se studieze viteza de reacţie de-a lungul unei perioade mai mari de timp, observându-se astfel efectul progresiv al acumulării produşilor, precum şi cel al scăderii substratului. În principiu este posibil să se obţină valori exacte ale parametrilor cinetici dintr-un număr destul de mic de experienţe, evitându-se astfel natura subiectivă a estimării vitezei iniţiale dintr-un grafic de forma unei curbe care în mod practic este imposibil să se realizeze fără erori. O curbă progresivă de reacţie conţine mult mai multă informaţie comparativ cu cea generată printr-o determinare a vitezei iniţiale prin extrapolare la timpul $t = 0$.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Până în prezent s-au menționat metodele de tratare a datelor de cinetică care presupun determinarea vitezei inițiale a reacției catalizate de enzimă pentru o serie de diferite concentrații de substrat. Datele pot fi reprezentate grafic conform cu una din transformările liniare ale ecuației, obținându-se astfel parametrii cinetici: K_m și V_{max}. Acest procedeu este echivalent cu metoda diferențială.

Un procedeu alternativ, care cel puțin în teorie, poate fi folosit pentru determinarea valorilor V_{max} și K_m, este acela de a introduce datele dintr-o singură curbă progresivă într-o ecuație de viteză integrată adecvat. Deoarece atât viteza de reacție cât și concentrația de substrat variază continuu în cursul reacției, o singură curbă progresivă poate genera o serie de puncte (viteză- concentrație) suficientă pentru determinarea vitezei maxime și a constantei K_m.

În scopul integrării ecuației Michaelis-Menten (ca orice altă ecuație de viteză) este necesară introducerea relațiilor care există între concentrațiile reactanților. Astfel, concentrația de substrat $[S]$ și concentrația de produs [P] nu sunt independente, suma lor fiind o constantă:

$$[S]+[P]=[S_0]$$

Deci, $[S]$ sau $[P]$, pot fi eliminate prin intermediul acestei ecuații. În consecință, ecuația Michaelis-Menten ($v_0 = \frac{V_{max}\cdot[S_0]}{K_m+[S_0]}$), o ecuație diferențială simplă, care redă viteza de dispariție a substratului sau viteza de formare a produsului, poate fi ușor integrată prin separarea variabilelor:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{max}\cdot[S]}{K_m+[S]} \qquad (2.39)$$

$$-\int_{t=0}^{t} V_{max}\,dt = \int_{[S_0]}^{[S_t]}\left(\frac{K_m}{[S]}+1\right)d[S] \Leftrightarrow$$

$$-V_{max}t = [S_t]-[S_0]+K_m\int_{[S_0]}^{[S_t]}\frac{d[S]}{[S]} \Rightarrow$$

$$-V_{max}t = [S_t]-[S_0]+K_m\ln[S_t]-K_m\ln[S_0]$$

De unde:

$$V_{max}t = K_m\ln\frac{[S_0]}{[S_t]}+([S_0]-[S_t]) \qquad (2.40)$$

unde:

$$[S_0]=[S]+[S_t]$$
$$[S_t]=[P]$$

Ecuația (2.40), reprezintă forma integrată a ecuației Michaelis-Menten și definește curba progresivă a unei reacții (sau evoluția reacției în timp) pentru care ecuația Michaelis-Menten continuă să fie valabilă pentru o perioadă mare de timp, de la începutul reacției.

În continuare în loc de a defini [P] în termeni de t, așa cum ar fi de dorit, se definește t în termeni de [P], acest lucru neconstituind un impediment mare în practică. Se recomandă

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

folosirea formei $\ln \frac{[S_0]}{[S]}$ a acestei ecuaţii de viteză integrate, deoarece prin aceasta se evită orice confuzie legată de cazul adăugării produsului la începutul reacţiei (când la t=0 , $[P_o] \neq 0$).

Ca şi forma ei diferenţială, ecuaţia (2.40) poate fi transformată în câteva alte ecuaţii, în scopul de a permite obţinerea unui grafic liniar:

$$\frac{1}{t}\ln\frac{[S_0]}{[S_0]-[P]} = \frac{V_{max}}{K_m} - \frac{1}{K_m}\frac{[P]}{t} \qquad (2.41)$$

$$\frac{t}{\ln\frac{[S_0]}{[S]}} = \frac{1}{V_{max}}\left[\frac{[S_0]-[S]}{\ln\frac{[S_0]}{[S]}}\right] + \frac{K_m}{V_{max}} \qquad (2.42)$$

$$\frac{[S_0]-[S]}{t} = V_{max} - \frac{K_m}{t}\ln\frac{[S_0]}{[S]} \qquad (2.43)$$

$$\frac{t}{[S_0]-[S]} = \frac{K_m}{V_{max}}\left(\frac{1}{[S_0]-[S]}\right)\ln\frac{[S_0]}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (2.44)$$

Din ecuaţia (2.42) se poate reprezenta grafic: $\frac{t}{\ln\frac{[S_0]}{[S]}} \rightarrow f\left(\frac{[S_0]-[S]}{\ln\frac{[S_0]}{[S]}}\right)$ care reprezintă o dreaptă având panta egală cu $1/V_{max}$ şi cu intersecţiile: K_m/V_{max} pe ordonată şi $-K_m$ pe abscisă, semănând deci cu graficul Hanes din cazul metodei vitezei iniţiale.

Grafice liniare se obţin şi din ecuaţiile (2.43) şi (2.44), care se aseamănă cu graficele Eadie şi respectiv, Linewaver şi Burk. În figura 2.12 se reprezintă grafic ecuţia 2.43.

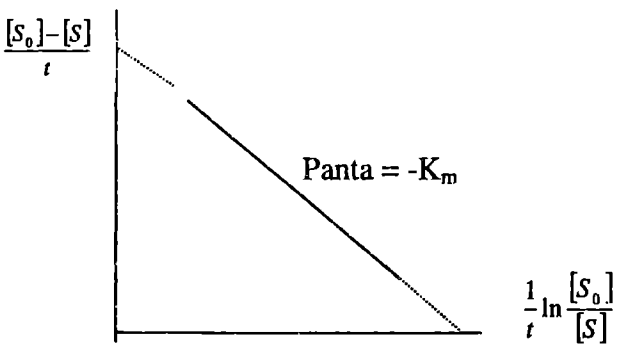


Fig. 2.12 Reprezentarea schematică a datelor de cinetică enzimatică, folosind ecuaţia Michaelis-Menten integrată (2.43).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Deci graficul din figura 2.12 dă naştere unei drepte cu panta $-K_m$ şi cu intersecţiile: V_{max}, pe ordonată şi V_{max}/K_m, pe abscisă.

Problema asociată folosirii graficului din figura (2.12) şi deci a ecuaţiei (2.43) este aceea că nu se face nici o ipoteză asupra mecanismului modificării vitezei iniţiale pe parcursul evoluţiei reacţiei.

Reacţia poate fi inhibată de produşi, să se apropie de o poziţie de echilibru sau poate suferi modificări în condiţiile experimentale folosite în timpul reacţiei, cum ar fi pH-ul.

Dacă reacţia enzimatică se supune unei cinetici de tip Michaelis-Menten pe toată durata experienţei, atunci, aşa precum rezultă din ecuaţia (2.43) şi figura 2.12, punctele obţinute pentru diferite concentraţii iniţiale vor fi pe aceeaşi dreaptă. Dacă poziţia dreptei se modifică cu concentraţia iniţială de substrat, atunci comportarea nu este descrisă de ecuaţia Michaelis-Menten (2.21).

Din ecuaţia (2.41), s-a reprezentat graficul $\frac{1}{t}\ln\frac{[S_0]}{[S_0]-[P]} \rightarrow f\left(\frac{[P]}{t}\right)$ redat în figura 2.13; graficul rezultat prezintă o pantă $=-1/K_m$ şi cu intersecţiile: V_{max}/K_m, pe ordonată şi V_{max}, pe abscisă:

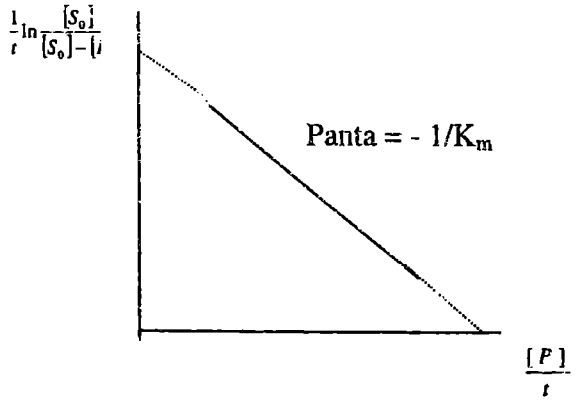


Fig. 2.13 Reprezentarea datelor de cinetică enzimatică în acord cu ecuţia (2.41)

Aplicarea acestei metode este simplă în condiţiile în care reacţia este ireversibilă şi atunci când produsul recacţie nu este inhibitor.

În toate cazurile este posibil, în principiu, să se determine V_{max} şi K_m dintr-o singură determinare (experienţă). În acest scop este necesar ca S_0 să fie mult mai mare decât K_m, iar reacţia să fie studiată până în situaţia în care (S_0- S) este mult mai mare decât K_m. Pentru ca această metodă să fie valabilă nu trebuie să existe o inhibiţie prin produşi.

Prin studiul vitezei iniţiale, inhibiţia prin produşi poate fi neglijată dacă reacţia este urmărită pe o perioadă scurtă de timp (când P = 0). Pe de altă parte, dacă reacţia este urmărită pe o perioadă mai lungă de timp inhibiţia prin produşi nu poate fi neglijată. Mai mult, este foarte dificil să distingem în cadrul unei singure experienţe, diferenţa între scăderea datorată dispariţiei substratului şi cea datorată inhibiţiei competitive prin produşii acumulaţi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.5. FACTORII CARE INFLUENȚEAZĂ CINETICA REACȚIILOR ENZIMATICE

Enzimele sunt proteine sau proteine conjgate conținând în structura lor și grupări neproteice. Activitatea lor catalitică depinde de menținerea structurii lor native, astfel încât orice modificare a condițiilor de mediu poate conduce la modificarea activității lor catalitice.

Principalii factori care influențează viteza inițială a unei reacții enzimatice și deci activitatea enzimelor sunt: pH-ul, temperatura, tăria ionică, concentrația de enzimă, concentrația de substrat, precum și diferiții activatori și inhibitori ai enzimelor. În cele ce urmează ne vom referi numai la influențele primilor trei parametrii, restul fiind tratați în capitolul 3.

2.5.1 EFECTUL TEMPERATURII

O reacție enzimatică totală, constă din trei stadii succesive: formarea complexului ES, convesia acestuia în complexul EP și disocierea în produși și enzima liberă. Efectul total al temperaturii asupra reacției va fi dat de suma efectelor separate asupra fiecărei etape.

Temperatura influențează viteza reacției enzimatice modificând stabilitatea enzimei, afinitatea enzimei pentru substrat, viteza de scindare a complexului ES, afinitatea enzimei pentru diferiți efectori. Enzimele au o temperatură optimă de funcționare de aproximativ 37-38^{0}C. La această temperatură se înregistrează o viteză maximă a reacției enzimatice. Un număr mic de enzime fac excepție de la această regulă generală. Astfel, peroxidaza, este o enzimă termostabilă, purificată uneori prin denaturarea celorlalte proteine la 80^{0}C. Papaina este, deasemenea, o enzimă stabilă la temperaturi ridicate, dar această proprietate este puternic dependentă de pH . Inactivarea termică a enzimelor este în mod cert datorată denaturării părții proteice a enzimei rezultată prin creșterea temperaturii.(figura 2.14).

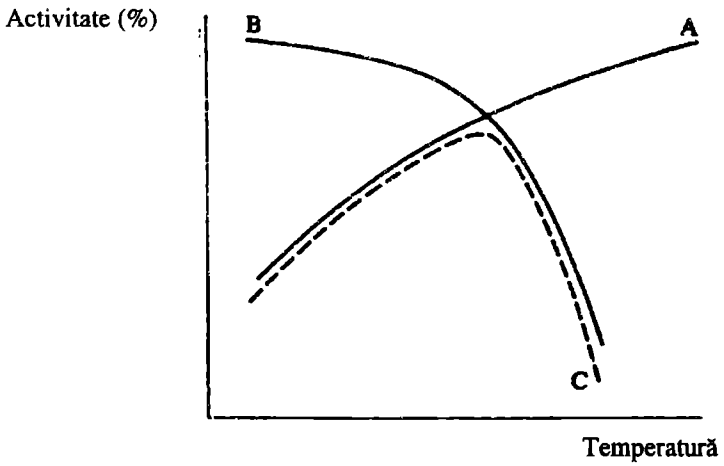


Fig. 2.14 Efectul temperaturii asupra reacțiilor catalizate enzimatic. Viteza unei recții chimice crește o dată cu temperatura (A) dar datorită apariției denaturării proteinei apare o scădere a cantității de enzimă activă (B). Cele două procese sunt redate schematic prin curba C reprezentând dependența de temperatură a unei enzime.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cu toate că în multe lucrări se indică o temperatură optimă de funcţionare a enzimelor, trebuie menţionat faptul că temeratura optimă pentru o anaumită reacţie catalizată enzimatic reprezintă un compromis dintre activitatea maximă pe o perioadă scurtă de timp şi pierderea activităţii datorată denaturării enzimei pe perioade mai mari de timp.

Efectul temperaturii asupra reacţiilor enzimatice este dat de coeficientul de temperatură, Q_{10} , care reprezintă factorul cu care viteza de reacţie creşte odată cu creşterea temperaturii cu 10^0C .

$$E = 2{,}303\ RT^2 \log Q_{10}/10 \qquad (2.45)$$

Coeficientul de temperatură al reacţiilor enzimatice are valori cuprinse între 1 şi 2, iar creşterea temperaturii va determina creşterea vitezei de reacţie şi descreşterea temperaturii va determina scăderea acesteia. În cele mai multe, cazuri prin creşterea temperaturii cu 10^0C viteza de reacţie aproximativ se dublează, fiind necesar deci un control riguros al temperaturii în cadrul oricărei determinări enzimatice (cinetice).

Uniunea Internaţională de Biochimie a recomandat iniţial folosirea unei temperaturi standard de 25^0C folosită în determinările enzimatice, dar ulterior au recomandat o temperatură de 30^0C datorită dificultăţilor întâmpinate pentru menţinerea unor temperaturi scăzute în regiuni cu un climat termic ridicat. Este posibilă transformarea activităţii enzimatice determinată la o anumită temperatură în unităţi echivalente corespunzătoare altor temperaturi folosind o serie de factori de conversie,dar acest lucru introduce o serie de erori. În cadrul determinărilor enzimatice este obligatoriu să se indice temperatura de lucru [4].

2.5.2 EFECTUL pH-ului

Enzimele sunt active numai într-un domeniu limitat de pH, în majoritatea cazurilor efectul catalitic fiind maxim la o anumită valoare de pH, denumit pH optim de acţiune. Există şi enzime care posedă o activitate maximă într-un domeniu mai larg de pH (figura 2.15). Astfel, glutaminaza are o activitate optimă la pH cuprins între 7,9 - 8,1. Majoritatea enzimelor au o activitate maximă în vecinătatea valorii fiziologice a pH-ului.

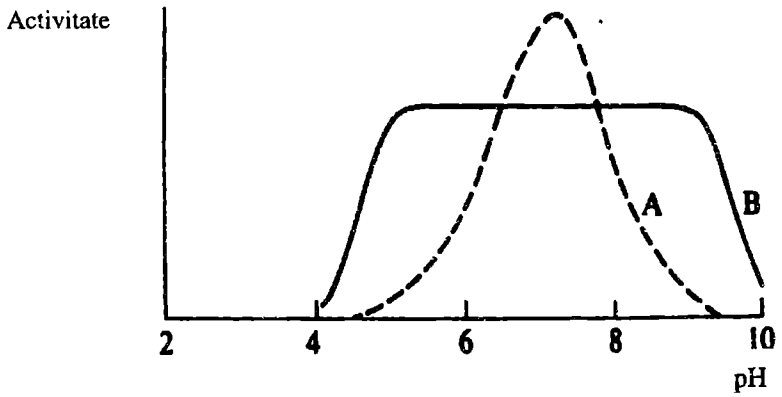


Fig. 2.15. Efectul pH-ului asupra enzimei lactat dehidrogenază. Enzima prezintă un maxim de activitate la pH=7.4 (A). Prin păstrarea enzimei în soluţii tampon de diferite pH-uri timp de o oră, se constată o păstrare a activităţii pe un domeniu de pH cuprins între 5 şi 9 şi o inactivare permanentă prin menţinerea enzimei la valori de pH în afara domeniului menţionat (B).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Un număr redus de enzime fac excepţie de la această regulă. De exemplu, pepsina prezintă activitate optimă la valori ale pH-ului cuprinse între 1 şi 4, prezentând un maxim de activitate la pH = 1,8. Câteva enzime au activitate catalitică maximă în domeniu puternic alcalin (de ex. arginaza în prezenţă de Mn^{2+} prezintă un pH optim = 10).

pH-ul poate determina modificări ale stabilităţii enzimei, putând conduce la inactivarea enzimei (pierderea activităţii catalitice) precum şi ale afinităţii enzimei, care poate să scadă ş.a. Efectele pH-ului sunt datorate modificărilor stării ionice a resturilor de aminoacizi ale enzimei şi a moleculelor de substrat, conducând la modificarea eficienţei de legare a substratului. Anumite resturile de aminoacizi sunt implicaţi în cataliză şi deci orice modificare a sarcinii lor va afecta viteza de reacţie. Concentraţia ionilor de hidrogen modifică viteza unei reacţii enzimatice prin schimbarea stării de ionizare a tuturor componentelor prezente în mediul de reacţie: enzimă, substrat, complexul ES. Pe un anumit domeniu de pH aceste efecte sunt reversibile dar ele devin ireversibile la valori extreme de pH, putând conduce la o denaturare totală a enzimei.

2.5.3 EFECTUL TĂRIEI IONICE

Prezenţa sărurilor străine poate afecta viteza de reacţie, fie prin modificarea echilibrului de formare a complexului activ, fie prin combinare cu reactanţii.
Primul efect denumit "efect de salinizare" de ordinu unu poate fi calculat pe baza formulei [8]:

$$\log K = \log K_0 + Z_A Z_B \sqrt{\mu} + (k_A + k_B - k^*)\mu \qquad (2.46)$$

unde: K = constanta de viteză a reacţiei
K_0 = constanta de viteză în absenţa substanţelor străine
$Z_A Z_B$ = sarcinile reactivilor A şi B
μ = tăria ionică
k_A, k_B, k^* = coeficienţi empirici pentru reactivii A, B şi respectivcomplexul activat.

Pentru a se obţine rezultate exacte, trebuie eliminaţi ionii străini care pot influenţa cinetica reacţiei şi realizat un control adecvat asupra tăriei ionice a mediului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

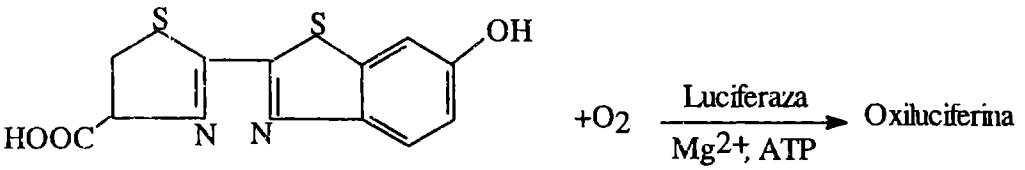
3. ANALIZA ENZIMATICĂ

Enzimele ocupă un loc important în biochimia analitică, studiul; lor presupunând existenţa unor metode de determinare adecvate. Ele pot fi considerate reactivi analitici care stau la baza unor metode sensibile şi specifice de determinare cantitativă a unor compuşi chimici de importanţă biochimică.

Prin analiză enzimatică se înţelege totalitatea tehnicilor chimice în care enzimele sunt folosite ca reactivi analitici pentru determinarea substratelor, inhibitorilor, activatorilor, coenzimelor, precum şi pentru determinarea însăşi a enzimelor [8].

Pentru că enzimele acţionează în cadrul sistemelor vii, complexe una din proprietăţile lor importante este *specificitatea.* O enzimă este specifică atât pentru tipul reacţiei pe care o catalizează cât şi pentru tipul substratului pe care îl accepta. *Specificitatea* este caracteristică cea mai semnificativă a enzimelor şi probabil că în viitor enzimele vor fi definite în mod simplu drept *"catalizatori foarte specifici".* O enzimă este deci capabilă să catalizeze o reacţie particulară a unui substrat particular, chiar dacă în mediul de reacţie sunt prezenţi şi alţi izomeri ai substanţei sau substrate similare. Aceasta rezolvă o problemă importantă din chimia analitică şi anume analiza unui compus în prezenţa altora similari cu care primul poate interfera în cadrul analizei.

Un exemplu al *specificităţii* enzimelor faţă de un substrat particular este ilustrat de acţiunea luciferazei, care catalizează oxidarea luciferinei la oxiluciferină:



Studiindu-se diferiţi compuşi similari ca structura luciferinei, s-a constatat că, oxidarea catalitică, conduce la producerea unei fluorescenţe verzi, care are loc numai in prezenţa luciferinei [8].

Un alt exemplu de *specificitate* absolută îl constituie acţiunea glicerol kinazei asupra glicerolului când se formează L-glicerol-3-fosfat (nu se formează niciodată glicerol -1-fosfat) figura 3.1.

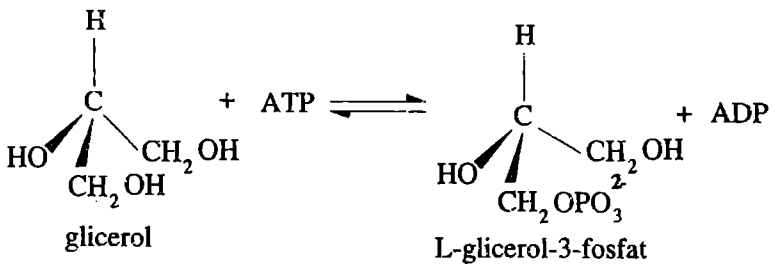


Fig. 3.1 Reacţia catalizată de glicerol kinază

Glucoz-oxidaza care catalizează oxidarea glucozei la acid D-gluconic reprezintă un exemplu de enzimă cu specificitate mare faţă de substrat; studiindu-se un număr de peste 60 de zaharuri oxidabile s-a observat că numai β-D-glucoza, 2-deoxi-D-glucoza

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

şi 6-deoxi-fluoro-D-glucoza sunt oxidate cu o viteza apreciabilă. Anomerul α-D-glucoza este oxidat catalitic cu o viteză foarte mică (0,6% din cea de oxidare a β-D-glucozei).

Activitatea catalitică a enzimelor este proprietatea componentului major al acestora şi anume proteina. Relativ la mecanismul lor de acţiune, se poate menţiona faptul că reacţiile catalizate de enzime apar prin interacţia substratelor cu o mică parte (≈ 1%) din aria suprafeţei totale a enzimelor denumită *centru activ*.

Regiunea din macromolecula proteică care conţine *centrii de legare* şi *catalitici* se numeşte *centru activ* al enzimei (figura 3.2).

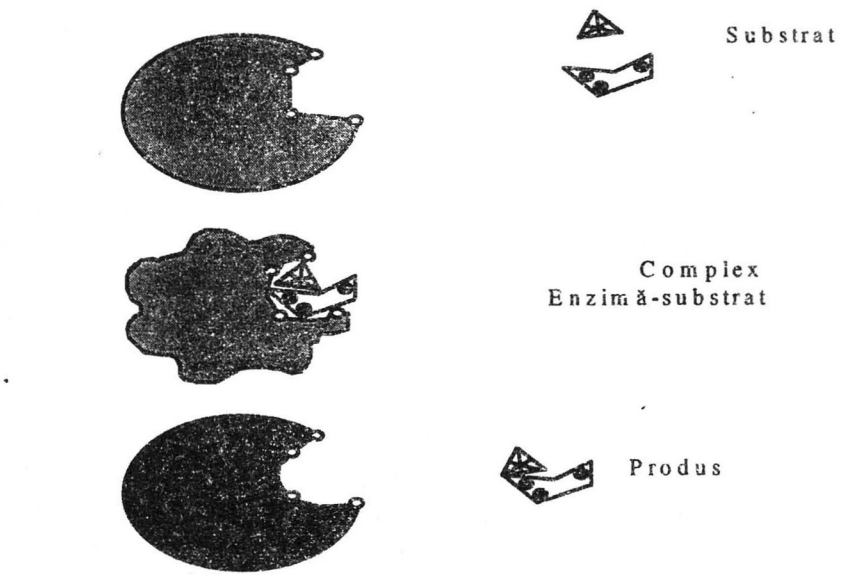


Fig. 3.2 Reprezentarea schematică a interacţiei dintre o enzimă implicând centrul activ (o) şi substratul ei specific.

Centrul de legare (fixare) al substratului include catenele laterale ale aminoacizilor care sunt implicate în legarea substratului la nivelul centrului activ. *Centrul catalitic* al enzimei include catenele laterale ale aminoacizilor implicaţi în procesul de cataliză enzimatică (figura 3.3).

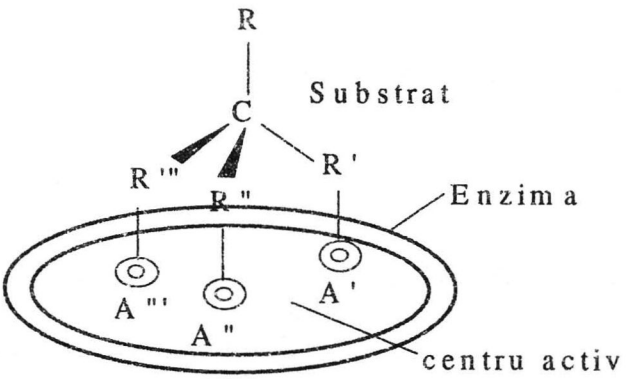


Fig. 3.3 Reprezentarea schematică a centrelor de interacţie dintre enzimă şi substrat. unde: A',A" şi A"' sunt centrii ai enzimei care interacţionează cu grupările R',R" şi R"' ale substratului; A' şi A"' sunt centri de legare şi A" este centrul catalitic

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Datorită condiţiilor blânde folosite în cadrul analizei enzimatice, se pot, deseori identifica şi determina substanţe labile, care prin utilizarea altor metode chimice de analiză sunt determinate într-un mod imprecis (se pot determina radicalii liberi care rezultă din reacţii şi deci se poate studia mecanismul reacţiei respective).

O altă proprietate importantă a enzimelor o reprezintă *capacitatea catalitică*; prin analiza enzimatică pot fi determinate cantităţi de substanţe de până la 10^{-10}g.

Specificitatea enzimelor şi *capacitatea lor de a cataliza* reacţii ale substratelor la concentraţii mici reprezintă un mare avantaj în analiza chimică, ceea ce a făcut ca acestea să fie privite ca reactivi analitici.

Prin utilizarea enzimelor în cadrul analizei chimice se poate elimina etapa de separare a componenţilor unui amestec, ceea ce conduce la scurtarea timpului de efectuare al analizei[8].

3.1. MECANISMUL ENZIMATIC

O primă etapă în reacţiile catalizate enzimatic, o reprezintă legarea reactanţilor la suprafaţa enzimei, iar una dintre funcţiile enzimei este aceea de a orienta reactanţii unul faţă de celălalt. Această idee a fost sugerată de către Fischer care a introdus ipoteza "lacătului şi chieii", relativă la interactia dintre enzimă şi substrat (enzima fiind lacătul şi substratul chieia); această teorie era una mecanicistă în care proteina era privită ca având o structură rigidă, teoria explicând parţial specificitatea unei enzime faţă de un substrat particular. Ipoteza lui Fischer nu explică posibilitatea legării şi a altor molecule de substrat cu o structură chimică apropiată de cea a substratului particular şi care pot fi catalizate cu viteze de reacţie mult mai mici.

Teoria lui Coshland are la bază ipoteza "inducerii prin potrivire", care presupune că, o dată cu legarea substratului are loc o modificare a conformaţiei enzimei rezultând într-o orientare corectă şi adecvată, a grupărilor reactive aparţinând atât enzimei cât şi substratului. Această ipoteză sugerează idea flexibilităţii structurii enzimatice [4].

Multe reacţii enzimatice decurg ca o consecinţă a atacului nucleofilic sau electrofilic asupra substratului, primul fiind cel mai des intâlnit în practică. Reactivii nucleofili sunt donori de electroni. Dacă reacţia de catalizat este următoarea:

$$A\text{-}X \rightarrow A^{+} + X^{-}$$

atunci în urma unui atac nucleofil (C^{-} este catalizatorul), reacţia decurge mult mai uşor :

$$C^{-} \curvearrowright A\text{-}X \rightarrow C\text{-}A + X^{-}$$

În urma ruperii unei legături este important de a se stabilii natura grupării îndepărtate pentru a se determina energia de activare. Bazicitatea unei grupări poate fi corelată cu caracterul ei nucleofil astfel încât dacă, bazicitatea grupării îndepărtate scade, va scădea şi tendinţa de reformare a legăturii rupte:

$$H^{+} + A\text{-}X \rightarrow A\text{-}X\text{-}H^{+}$$

$$C \curvearrowleft A\text{-}X\text{-}H^{+} \rightarrow C\text{-}A + H^{+}X$$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Exemplul de mai sus corespunde catalizei acide şi efectul ei este acela de a îndepărta electronii de la gruparea implicată în reacţie. De cele mai multe ori atât cataliza acidă cât şi atacul nucleofil sunt implicate în reacţiile catalizate enzimatic redate prin mecanismul "push-pull".

3.2. ACTIVAREA ŞI INHIBAREA ENZIMELOR

În literatură sunt descrise numeroase exemple de enzime care necesită diferite substanţe pentru a-şi manifesta activitatea catalitică. Exemple în acest sens sunt catalaza care conţine hemul drept grupare prostetică sau ascorbat oxidaza care conţine atomi de cupru. O serie de anioni şi cationi conduc la o creştere a activităţii enzimelor ei fiind denumiţi activatori. Activarea anionică este ne-specifică existând multe exemple în acest sens (ex. amilaza este activată de o serie de anioni şi în special de ionii de clor). Activarea cationică este mult mai specifică, prezenţa ionilor de magneziu fiind esenţială de exemplu în cadrul reacţiilor în care sunt implicate moleculele de ATP şi ADP, fiind foarte probabil ca iniţial ionii de magneziu să se lege de substrat şi nu de enzimă.

O substanţă care conduce la scăderea activităţii enzimelor poartă denumirea de inhibitor; efectul lor poate fi reversibil sau ireversibil. Inhibarea prin substanţe care reprezintă produşi de reacţie prezintă importanţă în controlul metabolismului celular, în timp ce inhibarea selectivă a anumitor enzime reprezintă baza unor procese farmacologice şi chemoterapeutice. Despre aplicaţiile reacţiilor enzimatice inhibate selectiv în biochimia analitică se va discuta într-un capitol separat.

3.3. ALOSTERIE

Enzimele alosterice prezintă o serie de efecte de activare şi inhibiţie competitive, care sunt corelate cu modificările conformaţionale ale structurii enzimatice. Enzimele alosterice prezintă importanţă în cadrul metabolismului, ele exercitând un control asupra reacţiilor care au loc în diferite organisme . Numele de alosterie se referă la faptul că inhibiţia enzimei se datorează unor substanţe care prezintă o structură si formă diferită de cea a substratului . Conceptul de bază al enzimelor alosterice a fost iniţial propus de Monod şi reprezintă o extensie a teoriei "inducerii prin potrivire" dată de Coshland [8]. Pentru a-şi manifesta activitatea catalitică o enzimă alosterică trebuie să existe intr-o conformaţie care să permită legarea substratului.

Structura acestora este flexibilă şi este stabilizată numai prin legarea altor molecule. Prin urmare, legarea unui activator de centrul său specific, conduce la modificări conformaţionale ale enzimei făcând posibilă legarea eficientă a substratului. Spre deosebire de acesta, un inhibitor care se leagă de centrul său specific poate conduce la o modificare atât a structurii de legare a substratului cât şi a activatorului (figura 3.4).

6-posfofructochinaza (E.C.2.7.1.11) o enzimă importantă în metabolismul glicolitic, este inhibată de ATP şi citrat , fiind activată de AMP, ADP şi substratul ei, 6 –fosfatfructoza. Aceste efecte fac ca activitea ei să fie redusă atunci când concentraţia compuşilor cu energie înaltă este mare sau atunci când există o sursă adecvată de energie rezultată din ciclul acidului citric. Enzima este activată de către compuşi a căror prezentă în concetraţii mari sugerează o lipsă a compuşilor de energie înaltă în celulă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

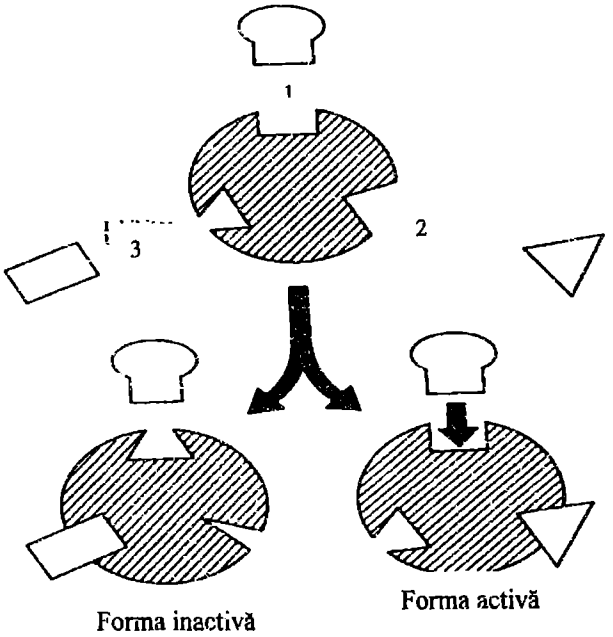


Fig. 3.4 Enzime alosterice. Legarea activatorului stabilizează enzima în forma ei activă, în timp ce legarea inhibitorului modifică conformaţia centrului activ ducând la pierderea activităţii. (1) Centrul de legare al substratului, (2) centrul de legare al activatorului şi (3) centrul de legare al inhibitorului.

3.4 IZOENZIME

Enzimele care prezintă aceeiaşi funcţie catalitică sunt denumite enzime omoloage şi sunt împărţite în două clase. Heteroenzimele sunt obţinute din diferite surse şi cu toate că ele catalizează aceiaşi reacţie ele posedă proprietăţi fizico-chimice şi cinetice diferite. Enzima hidrolitică α-amilaza se găseşte în secreţia pancreatică umană ea fiind diferită de enzimele cu acelaşi nume rezultate din bacterii sau malţ. Iso-enzimele sunt forme moleculare diferite ale aceleiaşi enzime care se găsesc în acelaşi organism sau animal, ele prezentând deseori un anumit profil de distribuţie în ţesuturi.

Multe dintre izoenzimele existente sunt rezultatul hibridizării dintr-un număr limitat de subunităţi (cum este cazul lactat dehidrogenazei). Unele enzime prezintă forme multiple datorită creşterii gradului de polimerizare a unei singure subunităţi; acestea nu trebuie privite ca izoenzime deoarece ele nu au la bază diferenţe genetice între diferitele forme. Colinesteraza, de exemplu, prezintă cinci forme, constând dintr-o singură subunitate, şi existând sub formă de de monomeri, dimeri, trimeri, tetrameri, şi pentameri.

Lactat de hidrogenaza (1.1.1.27) reprezintă un exemplu de izoenzimă tipică. În organismul uman aceasta este compusă din două subunităţi proteice diferite cunoscute sub numele de A şi B, structurate sub forma unor tetrameri (figura 3.5), dând naştere la cinci forme hibride diferite rezultate din cele două unităţi de bază. Subunităţile A şi B sunt enzimatic inactive dar toţi tetramerii sunt activi; deasemenea datorită compoziţiei lor diferite pot fi separaţi unul de altul prin electroforeză sau prin

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cromatografie de schimb ionic. Tetramerii prezintă proprietăţi catalitice diferite relative la specificitatea de substrat şi cinetica de inhibiţie.

Izoenzimele sunt distribuite în diferite ţesuturi şi spre exemplu forma B4 a lactat dehidrogenazei, se găseşte în special în muşchiul inimii iar forma A4 numai în muşchiul oaselor. (**skeletal**), dar în general ele sunt prezente în diferite cantităţi în toate ţesuturile.

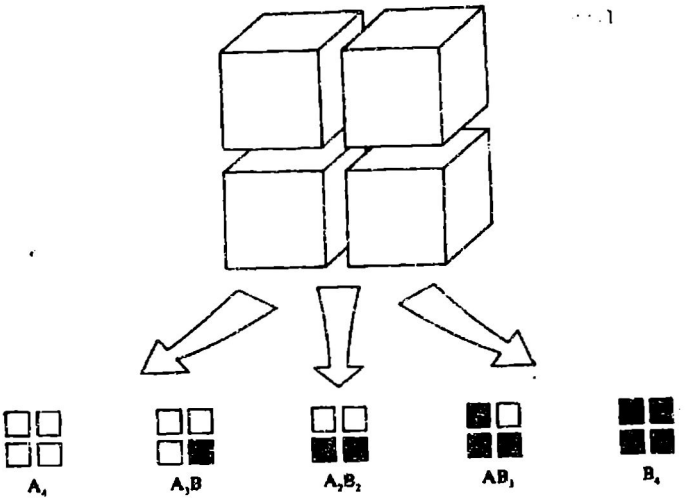


Fig. 3.5 Structura cuaternară a proteinelor. Lactat dehidrogenaza are o greutate moleculară de aproximativ 140.000 D, ea existând sub forma unui tetramer rezultat prin asocierea a două proteine globulare diferite (A şi B) ceeace conduce la existenţa a 5 forme hibride active diferite ale enzimei. Peptidele A şi B sunt inactive enzimatic fiind deseori notate prin M (muşchi) şi H (inimă).

Izoenzimele diferă între ele în special prin capacitatea lor catalitică. Ele sunt activate sau inhibate în mod diferit, permiţând unei izoenzime să funcţioneze în condiţii care reduc activitaea altei izoenzime; prin astfel de efecte se asigură un control asupra unei aceiaşi reacţii care paote avea loc în condiţii celulare sau tisulare diferite.

În studiul enzimelor este de dorit să se poată determina nu nunai activitatea acestora dar şi procentul activităţii izoenzimelor. Utilizarea inhibitorilor, care au o influenţă mai mare asupra unei izoenzime comparativ cu alta sau, alterarea specificităţii reprezintă o soluţie în sensul menţionat mai sus.

3.5 DETERMINĂRII ENZIMATICE

Determinările enzimatice trebuiesc efectuate în condiţii de pH, temperatură, tărie ionică şi de concentraţie a reactivilor folosiţi optime pentru activitate. De aceea, înaintea realizării unui procedeu de determinare a activităţii enzimelor, este necesară cunoaşterea, din datele de literatură a unor parametrii cum sunt pH-ul şi temperatura optimă, cunoaşterea cofactorilor, activatorilor, inhibitorilor şi a valorilor de K_m .

3.5.1 DETERMINAREA ENZIMEI

Scopul determinărilor enzimatice este acela de afla câtă enzimă având caracteristici cunoscute este prezentă într-o probă a unui omogenat tisular sau în lichidele biologice. În cadrul unor astfel de determinări trebuie avut în vedere faptul că menţinerea organizării şi integrităţii celulare, reprezintă o caracteristică a vieţii şi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

că distrugerea celulară prin procese naturale (autoliză), însoţită de modificări enzimatice şi descompunerea cofactorilor, începe odată cu moartea unui organism sau cu izolarea unui ţesut. Autoliza este minimalizată dacă ţesutul este păstrat la 4° C, atât înainte cât şi după prepararea omogenatelor acestuia. Deasemenea, multe enzime se denaturează la temperaturi înalte sau moderate, acesta fiind un motiv în plus de a păstra probele biologice sau preparatele rezultate din acestea, la temperaturi scăzute înainte de a se efectua determinarea enzimatică.

Determinarea activităţii unei enzime are un domeniu larg de aplicaţii. Determinările enzimatice prezintă importanţă în domeniul chimiei şi biochimiei analitice, al alimentaţiei, agriculturii, chimiei clinice şi în special în identificarea diferitelor dereglări metabolice ale organismului. Deasemenea, sunt necesare procedee exacte de determinare a enzimelor pentru a se realiza metode analitice de analiză a diferitelor substanţe (substrate), a unor cofactori precum şi a activatorilor şi inhibitorilor enzimatici.

Deoarece enzimele sunt caracterizate prin reacţiile pe care ele le catalizează concentraţia unei enzime poate fi determinată măsurând viteza cu care aceasta este capabilă să catalizeze reacţia ei specifică (metoda cinetică).

3.5.1.1. *Determinarea enzimelor prin analiza cinetică a activităţii catalitice*

Metoda cea mai utilizată de estimare a concentaţiei unei enzime dintr-un preparat biochimic este aceea de a se determina activitatea ei catalitică, cu alte cuvinte să se afle cât substrat este transformat în produs într-o unitate de timp şi în condiţii specifice.

După cum s-a arătat, viteza iniţială a unei reactii catalizate enzimatic este proporţională cu concentraţia iniţială de enzimă [E_0], aşa cum rezultă din ecuaţia Michalis – Menten:

$$v_0 = \frac{k_{+2}[E_0][S_0]}{K_m + [S_0]}$$

Această dependenţă este redată în figura 3.6.

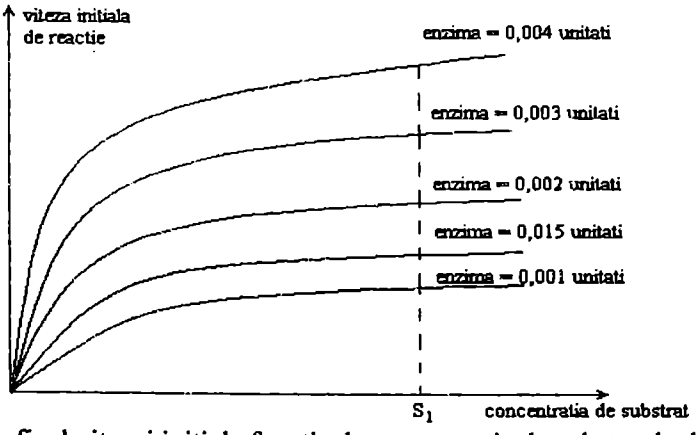


Fig. 3.6. Graficul vitezei iniţiale funcţie de concentraţia de substrat la diferite concentraţii de enzimă. S_1 = concentraţie de substrat nelimitativă [8].

La o concetraţie constatntă de substrat S_0, viteza iniţială v_o este direect proportională cu concentraţia de enzimă [E_0]. Cu toate că în teorie pentru o concentraţie fixă de subtrat această relaţie este adevărată, în practică este mult mai

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

utilă situaţia în care concencentraţia de substrat este suficient de mare astfel încât enzima să fie saturată cu substrat. Acest lucru se justifică din două motive principale; în primul rînd, integrarea ecuaţiei Michaelis-Menten (a se vedea paragraful 2.4.2.), redă faptul că porţiunea lineară a fazei stării staţionare a reacţiei este mult mărită pe măsură ce gradul de saturare al enzimei creşte (toţi ceilalţi factori fiind menţinuţi constanţi). Cu alte cuvinte, în termeni simplii, acest lucru se datorează faptului că viteza de transformare a substratului este nesemnificativă relativ la concentrţia totală a substratului prezent, în condiţiile în care concentraţia iniţială de substrat creşte. Din aceste motive rezultate mult mai precise ale vitezei initiale se obţin la concentraţii iniţiale mari de substrat comparativ cu cele obţinute la valori mici ale acestuia.

În al doilea rând, aşa cum s-a demonstrat, la valori mari de $[S_0]$ din ecuaţia Michaelis-Menten rezultă că $v_0 = k_{+2}\ [E_0]$ şi deci v_0 nu variază odată cu micile modificări ale $[S_0]$; aceasta înseamnă ca se pot obţine rezultate precise fără a menţine concentraţia substratului la o valoare fixă, presupunând că substratul se găseşte într-o concentraţie suficientă ca să satureze enzima. În concluzie cu cât este mai mare concentraţia de substrat cu atât determinarea este mai precisă.

În acord cu ecuaţia Michaelis-Menten, o enzimă este saturată de substratul ei numai la concentraţii foarte mari de substrat, astfel încît condiţiile experimentale realizate practic sunt apropiate valorii saturării complete. Ecuaţia permite calculul valorii v_0/V_{max} pentru ficare valoare a concentraţiei iniţiale de substrat, în ipoteza că valoarea constantei K_m este cunoscută (vezi tabelul 2.1, din capitolul 2). Trebuie menţionat faptul că valorile rapoartelor v_0/V_{max} şi ale saturării parţiale sunt independente de concentraţia de $[E_0]$, presupunând că $[S_0] >> [E_0]$. Cu toate acestea valorile de v_0 şi V_{max} variază cu concentraţia de $[E_0]$, ceea ce reprizintă cheia problemei în cadrul determinării enzimelor prin metodă cinetică.

Din cele expuse mai sus, ar rezulta faptul că un procedeu utilizat pentru determinarea enzimei poate fi îmbunătăţit prin creşterea concentraţiei de substrat, fară limită, dar în mod cert şi alţi factori trebuie luaţi în considerare incluztnd: solubilitatea substratului, preţul de cost al acestuia şi posibila inhibiţie prin substrat (vezi capitolul 4). Deci alegerea concentraţiei de substrat reprezintă în final un compris.

Prin folosirea unei concentraţii de substrat în exces, reacţia prezintă o viteză maximă care este proporţională cu cantitatea de enzimă prezentă. În acest scop, este suficcient să se utilizeze o concentraţie de substrat care este de cel puţin 10 ori mai mare decât valoarea constantei K_m a enzimei. Cu toate că viteza maximă poate fi numai teoretic atinsă la o concentraţie infinită de substrat prin folosirea ecuaţiei Michaelis-Menten, este posibilă calcularea procentului vitezei maxime pentru o anumită concentratie de substrat. Cu toate că în determinările enzimatice este de dorit să se folosească concentraţii mari de substrat, unele enzime prezintă o inhibiţie datorată acestuia, care are caracteristicile prezentate în figura 3.7. În astfel de cazuri trebuie aleasă concentraţia de substrat pentru care se obţine maximum de viteză. Este important ca în cadrul determinărilor enzimatice să se raporteze procentul de viteză maximă, obţinut în cadrul metodei.

Dacă reacţia implică mai multe substrate, atunci trebuiesc stabilite concentraţiile fiecăruia, preferabil la valori dapropiate de cele de saturare.

Viteza reacţiilor catalizate enzimatic, depinde şi de concentraţia cofactorilor. La fel ca şi în cazul substratelor fiecare cofactor trebuie să existe la o concentraţie fixă, de preferat în exces, în scopul obţinerii unei metode precise şi reproductibile de determinare a enzimelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

De asemenea se impune necesitatea existenței unei metode adecvate de studiere a reacției enzimatice, ceea ce presupune ca în cadrul sistemului de analizat, pe măsura transformării subtratului în produs, să existe o modificare a unui parametru fizico-chimic (optic, electric, etc.); dacă nu apar astfel de modificări reacția poate fi urmărită în mod indirect prin cuplarea ei cu o a doua reacție catalizată enzimatic (reacție indicatoare), în care pot apărea astfel de variații.

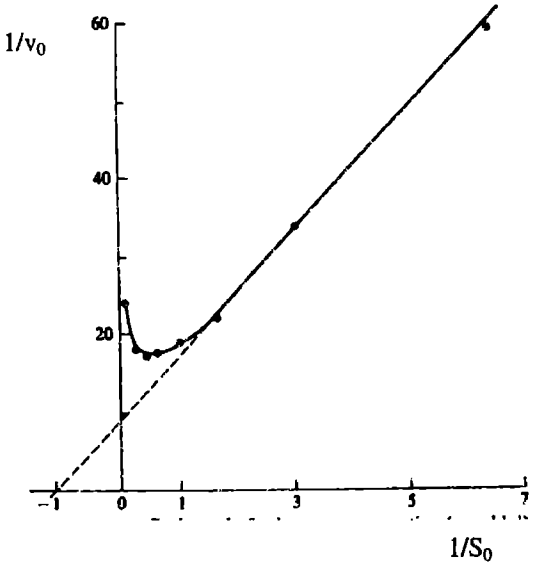


Fig. 3.7 Inhibiția prin substrat. L aminoacid oxidaza este inhibată de substrat la concentrații de L-leucină mai mari decât 3 mM. Graficul Lineweaver-Burk redă devierea de la linearitate a curbei obținute în această situație.

Viteza este măsurată fie prin urmărirea vitezei de dispariție a unui substrat, fie (de preferat) prin viteza de formare a unui produs (în practică este mult mai precis să se determine o creștere a unei cantități mici în mediul de reacție, decât să se măsoare o scădere mică a unei cantități mari). În urma realizării unor astfel de măsurători se obține graficul concentrației de produs format în funcție de timp numit și curbă progresivă de reacție (figura 3.8).

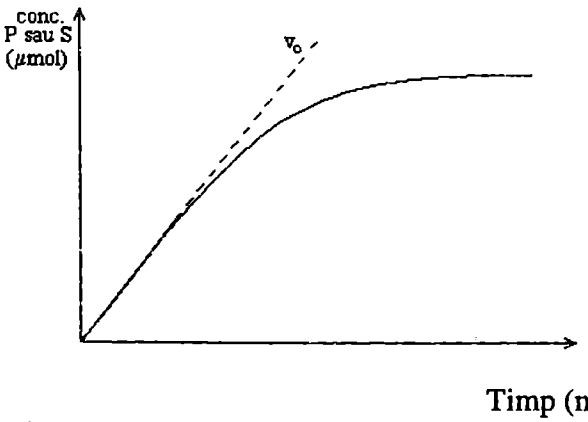


Fig. 3.8 Curba viteză-timp sau curba progresivă pentru o reacție enzimatică. Viteza inițială v_0 este determinată din panta tangentei trasată din originea curbei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Atribuirea unei reacţii enzimatice a unui ordin clasic pentru reacţii necatalizate (ordinul 1 sau 2) este de obicei imposibilă. De aceea prin viteza unei reacţii enzimatice se înţelege întotdeauna viteza iniţială v_0. Viteza iniţială, aşa cum este ea indicată prin tehnicile obişnuite de măsurare, se obţine numai atunci când complexul enzimă-substrat este format şi concentraţia lui este staţionară. Numai atunci când a fost atinsă concentraţia optimă a complexului enzimă-substrat (ES) viteza etapei descompunerii complexului ES în enzimă şi produşi este maximă. Etapa formării complexului ES poate fi măsurată numai în cazul reacţiilor foarte lente şi cu instrumente foarte sensibile.

Pentru ca determinările enzimatice să fie valabile ele trebuie în condiţiile vitezei iniţiale, înţelegând prin aceasta că viteza trebuie măsurată pe domeniul de liniaritate al curbei progresive, curba concentraţiilor de substrat transformat sau produs format în timp, deoarece după echilibru curba se aplatizează (figura 3.8).

Măsurând viteza iniţială,v_0, reacţia se studiază în condiţiile în care se aproximează ireversibilitatea, se elimină erorile introduse de reacţia inversă, cele introduse prin denaturarea enzimei, inhibiţia prin produsul de reacţie şi erorile introduse prin scăderea concentraţiei de substrat sub nivelul necesar pentru a menţine enzima în forma complexului enzimă-substrat de-a lungul stării staţionare.

Vitezele iniţiale v_0 sunt măsurate ca tangente la originea curbelor progresive la $t = 0$ (figura 3.8) ele fiind exprimate în unităţi de μmol produs format / minut.

După cum s-a menţionat, în cadrul unei determinări enzimatice trebuie demonstrat că viteza iniţială este proporţională cu cantitatea de enzimă adăugată (lucru valabil cel puţin în primele momente ale reacţiei). Teoretic, trebuie observată o creştere a vitezei pentru fiecare creştere în concentraţia de enzimă până la infinit. Deviaţiile de la linearitate cu concentraţia de enzimă pot fi datorate limitărilor din condiţiile experimentale sau prezenţei inhibitorilor (figura 3.9). Uneori, se observă o deviere de la linearitate la concentraţii mari de enzimă. Aceasta nu indică o scădere reală a activităţii enzimei, ci reprezintă o limitare în tehnica de măsurare. Inhibitorii pot fi îndepărtaţi prin purificarea enzimei. Limitările datorate condiţiilor de determinare (figura 3.9, curba B) sunt eliminate prin creşterea concentraţiei substratului limitativ astfel încât v_0 să devină din nou direct proporţională cu $[E_0]$.

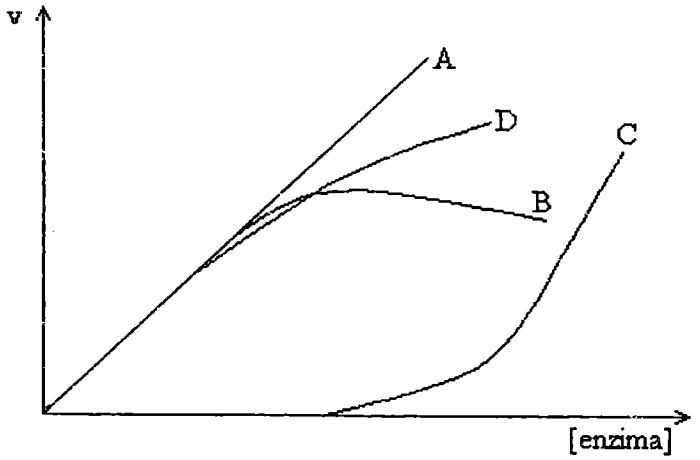


Fig. 3.9 Efectul concentraţiei de enzimă asupra vitezei iniţiale. Curba A redă o reacţie care se comportă normal: curba B este aceea a unei reacţii care are insuficient substrat pentru a satura enzima la concentraţii mari ale acesteia E; curba C redă tipul de curba obţinută dacă în soluţia substratului există un inhibitor pentru care enzima prezintă o afinitate mare; curba D redă tipul de curbă obţinută dacă în soluţia enzimatică există o substanţă inhibitoare [4].

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Deci, dintr-o măsurătoare a vitezei inițiale și un grafic de calibrare a vitezei în funcție de concentrația de enzimă se poate calcula ușor concentrația catalizatorului biochimic (a enzimei). Această proporționalitate formează baza metodelor folosite în determinarea concentrației de enzimă în proba necunoscută. Pentru majoritatea reacțiilor enzimatice, cel puțin în primele etape ale acesteia viteza de reacție este proporțională cu concentrația de enzimă (figura 3.10).

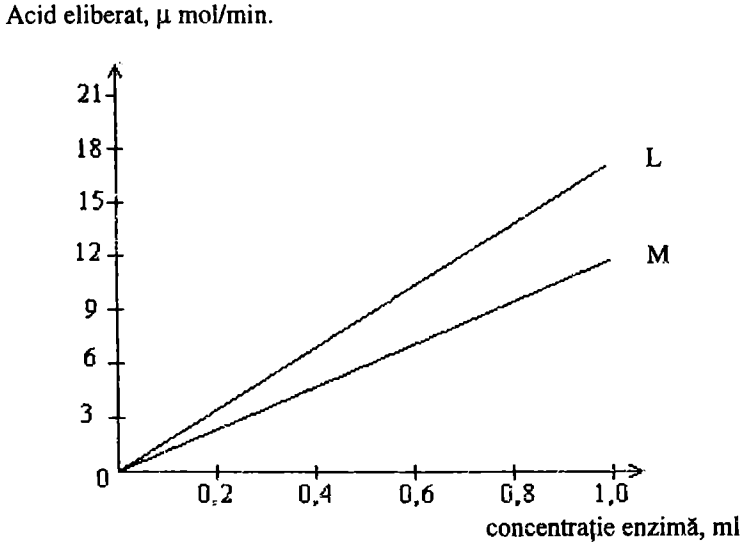


Fig. 3.10 Hidroliza laptelui gras (L) și a uleiului de măsline (M) funcție de concentrația de enzimă (lipază purificată din lapte).

Dacă reacția enzimatică este lăsată să decurgă în timp, viteza ei scade. Acest lucru este prezentat în curba din figura 3.11, care redă grafic transformarea enzimatică progresivă a substratului în timp. În general, curbele progresive sunt liniare dacă în timpul reacției enzimatice nu a fost transformat mai mult de 10 – 20 % din substrat. Scăderea ulterioară a vitezei reacției enzimatice se datorează mai multor cauze.

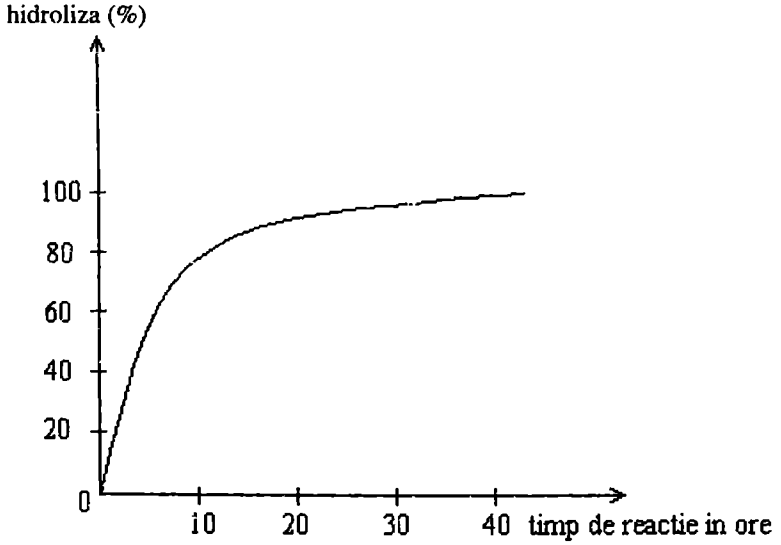


Fig. 3.11 Hidroliza progresivă uleiului de măsline cu lipaza fungică funcție de timp.

S-a observat că, în cazul unor enzime se obțin curbe nelineare ale vitezei funcție de concentrația acesteia, de obicei prezentând o aplatizare spre axa orizontală. Un exemplu în acest sens îl reprezintă proteazele care acționează asupra proteinelor conform ecuației lui Schultz, $v_0 = k\,[E]^{1/2}$. Un număr de preparate proteazice care

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

acționează asupra hemoglobinei, urmează ecuația: $v_0 = k [E]^{2/3}$, care a fost utilizată în determinările activității proteolitice. Roy a demonstrat faptul că viteza reacției catalizate de arilsulfataza A, urmează o ecuație de forma: $v_0 = k [E]^{3/2}$, argumentând aceasta din punct de vedere teoretic ca un rezultat al dimerizării enzimei [8].

În toate aceste cazuri, deviația de la linearitate este dată, probabil, de prezența activatorilor sau inhibitorilor din preparatul enzimatic.

În cazul curbelor progresive de reacție neliniare intervalele la care se efectuează măsurătorile trebuie să fie mici (măsurători efectuate imediat după începerea reacției și apoi extrapolate la t = 0), deoarece în aceste cazuri se obțin valoari aproximative ale vitezelor inițiale, dar utile în cadrul determinărilor de rutină.

Gradul de avansare al unei reacții enzimatice poate fi urmărit prin metode chimice și instrumentale (fizico-chimice), studiindu-se modificarea în timp fie a concentrației substratului (a reactantului), fie a unuia dintre produșii de reacție.

Procedeele analitice folosite în obținerea rezultatelor cinetice sunt fie continue, fie discontinue.

Procedeele discontinue presupun luarea de probe din amestecul de raecție la timpi diferiți și analizarea acestora. În scopul analizării produsului sau a reactantului, reacția din proba de analizat trebuie stopată, în special dacă reacția decurge cu o viteză apreciabilă. În cazul determinărilor de acest tip, reacția trebuie stopată prin inactivarea enzimei lucru care se realizează în diferite moduri și anume: prin adăugarea unei substanțe care fie reacționează cu unul din reactanți fie inhibă reacția, prin scăderea temperaturii sub 4^0 C sau, dacă reacția este dependentă de pH, prin adăugarea rapidă a unui acid sau a unei baze care modifică pH-ul. În cazul determinărilor discontinue pot fi utilizate puncte experimentale individuale dacă probele au fost luate din porțiunea liniară a curbei progresive. Această porțiune nu depășește de obicei 5-10% din reacție.

Urmărirea continuă a reacției poate fi realizată prin intermediul metodelor instrumentale de analiză. Prin intermediul acestora reacția poate fi studiată urmărindu-se transformarea substratului sau formarea produșilor de reacție, prin monitorizarea directă a modificării unor parametrii fizico-chimici ai acestora sau, folosind o secvență de reacție cuplată. În general este de dorit ca reacția enzimatică fie urmărită într-un mod continuu, fără a lua probe din amestecul de reacție la diferiți timpi, care urmează a fi analizate, dar unele reacții nu au proprietăți care să permită o urmărire continuă a lor.

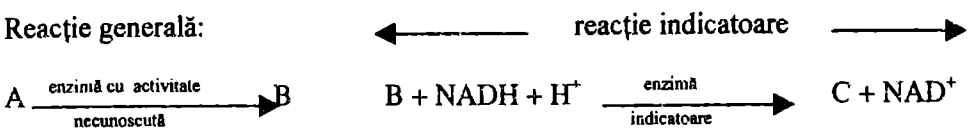
Spre deosebire de determinările de substrat, determinarea activității enzimatice se efectuează la o concentrație optimă de substrat și dacă este necesar soluția enzimatică se diluează. Reacția enzimatică trebuie să decurgă lent (cu câteva excepții) astfel încât la sfârșitul măsurătorii numai o mică parte din substrat să fie transformată.

3.5.1.2 Reacții enzimatice cuplate (Determinări cinetice cuplate)

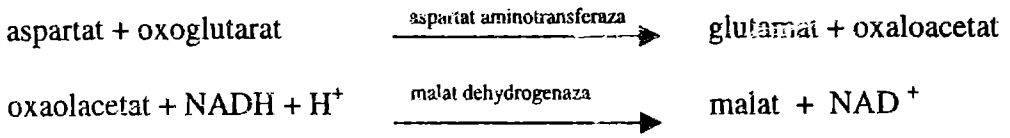
Uneori, este necesară folosirea procedeelor de determinare cuplate, în care produsul primei reacții (reacția de studiat) devine substrat pentru o doua reacție enzimatică (denumită reacție indicator) care este analizată mult mai ușor. Acest tip de reacții sunt utilizate și în situațiile în care echilibrul reacției de studiat (determinat) este nefavorabil. Rolul reacției indicatoare în determinarea activității enzimatice este acela de a indica cantitatea de produs de reacție (în exemplul de mai jos malatul) format în timp. Acest lucru este posibil numai dacă oxaloacetatul este redus extrem de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

rapid de către NADH. Viteza reacţiei catalizate enzimatic poate fi urmarită prin intermediul scăderii absorbanţei la 340 nm datorată oxidării NADH-ului.



Exemplu: enzima aspartat aminotransferaza (EC 2.6.1.1) conduce la formarea oxaloacetatului care poate fi transformat în acid malic prin intermediul enzimei malat dehidrogenază (EC 1.1.1.37) simultan cu transformarea NADH-ului în NAD^+ reacţie care poate fi studiată spectrometric la 340 nm.

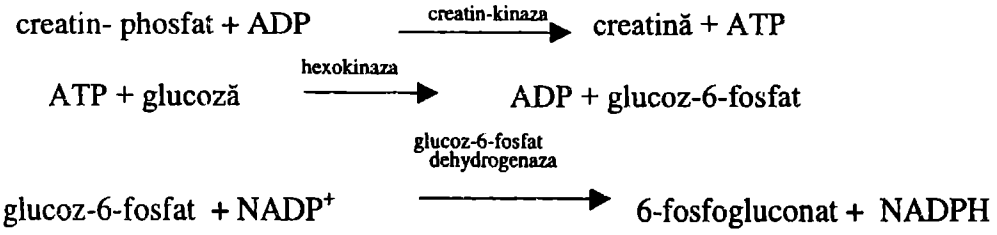


În acest exemplu malat dehidrogenaza este enzima indicatoare. Amestecul de reacţie în condiţiile determinărilor cuplate include substratele primei reacţii enzimatice (reacţie de testat) enzimele adiţionale precum şi reactivii necesari transformării produsului primei reacţii într-un produs final detectabil.

Condiţiile necesare realizarii unor determinări enzimatice având la bază reacţii cuplate presupun ca prima reacţie enzimatică să fie de ordinul zero în raport cu substratul şi ireversibilă, în timp ce reacţia indicatoare trebuie să fie de ordinul 1 în raport cu produsul primei reacţii şi ireversibilă.

În astfel de determinări este necesar ca enzima indicatoare să fie adăugată în exces ceea ce de altfel reprezintă şi un inconvenient al metodei (conduce la un consum mare de enzimă şi implicit la un preţ de cost ridicat/determinare).Viteza maximă pentru cea de a doua reacţie trebuie să fie de cel puţin zece ori mai mare ca cea a primei reacţii. In condiţiile determinărilor cuplate este necesar ca ambele enzime să funcţioneze aproape de optimul lor sau ca determinarea să fie realizată în două etape.

Multe determinări au la bază reaţii multi-enzimatice cum este şi cazul determinării creatin-kinazei (EC 2.7.3.2), care implică hexokinaza (EC 2.7.1.1) ca enzimă auxiliară şi glucozo-6-fosfat dehidrogenaza (EC l. 1.1.49) drept enzimă indicatoare:



Curba tipică de reacţie obţinută în cazul determinărilor directe prezentând o viteză maximă, se modifică de obicei în cazul determinărilor cuplate în care poate apărea o perioadă iniţială de "lag", perioadă în care concentraţia produşilor de legătură tinde spre o stare staţionară, viteza maximă fiind determinată în acest caz din curba având panta cea mai mare (figura 3.12). In cadrul unor astfel de determinări este dificil de determinat pH-ul optim al reacţei enzmiatice cuplate datorită prezenţei mai

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

multor enzime. De obicei se determină în mod separat pH-ul optim precum şi efectul diferitelor tampoane, a activatorilor şi inhibitorilor asupra enzimei test şi indicatoare, informaţia obţinută fiind utilizată în cadrul protocolului general de determinare a activităţii enzimei test. Selectarea pH-ului optim al protocolului nu este uşor de realizat datorită diferenţelor în pH-ul optim de acţiune al fiecărei enzime implicate în proces. În general, pentru obţinerea unei sensibilităţi maxime, se recomandă utilizarea pH-ului optim al enzimei test, scăderea proporţional a activităţii celorlalte enzime putând fi determinată din curbele pH-activitatte corespunzătoare şi compensată printr-un adaos suplimentar de enzimă în amestecul de reacţie.

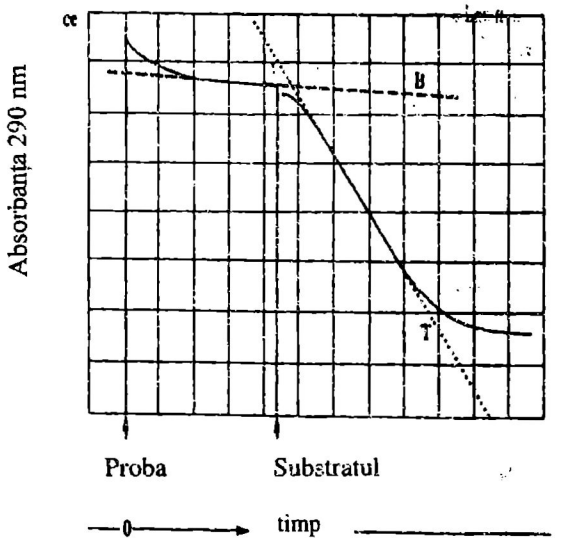


Fig. 3.12 Curba tipică de reacţie pentru determinările enzimatice cuplate. În cadrul unor astfel de determinări reacţia indicatoare va prezenta de cele mai multe ori modificări vizibile în urma adăugării probei dar şi înaintea adăugării substratului specific pentru reacţia test. Această reacţie blank se poate datora prezenţei în probă a substratelor endogene şi viteza ei (B) trebuie măsurată pentru a se putea calcula activitatea enzimei de testat (T-B) din viteza de reacţie totală (T) care rezultă în urma adăugării substratului.

Deoarece viteza iniţială este dependentă de temperatură, determinarea trebuie efectuată în condiţii controlate de temperatură. Acizii slabi sau bazele slabe folosite ca tampoane într-o determinare enzimatică trebuiesc testate pentru a fi siguri că ele nu inhibă enzima. În cadrul determinărilor enzimatice cuplate prezenţa inhibitorilot reprezintă o problemă, deoarece se poate întâmpla ca activatorul unei enzime să fie totodată inhibitorul alteia.

Factorul limitativ de viteză în cadrul unor astfel de determinări trebuie să fie concentraţia produsului primei recţii şi a produşilor reacţiilor ulterioare, toţi ceilalţi reactivi fiind în exces. În condiţii optime, viteza reacţiei indicatoare trebuie să fie egală cu viteza formării produsului iniţial al primei reacţii enzimatice (reacţie test). Viteza reacţiei indicatoare este definită prin ecuaţia Michaelis-Menten:

$$\text{Viteza reacţiei test} = \text{viteza reacţiei indicator} = \frac{V_{max} \times [P]}{K_m + [P]}$$

unde [P] reprezintă concentraţia produsului reacţiei test.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În condiţii normale concentraţia produsului este foarte mică şi aproximativ constantă datorită stabilirii unei stări staţionare între formarea şi consumarea acestuia în reacţia indicatoare. Deci:

$$\text{viteza} = \frac{V_{max}\ [P\ ]}{K_m}$$

Pentru ca reacţia indicatoare să decurgă în mod paralel (simultan) cu reaţia test, raportul V_{max}/K_m pentru enzima indicatoare trebuie să fie mult mai mare decât raportul similar pentru enzima test. Valoarea vitezei maxime (V_{max}) este singura variabilă din ecuaţie şi este determinată de cantitatea de enzimă prezentă, exprimată de obicei în unităţi/volumul amestecului de recţie.

După ce au fost stabilite condiţiile optime de determinare se poate scrie un protocol al modului de desfăşurare al reacţiilor implicate; acest protocol conţine concentraţiile şi volumele tuturor reactivilor folosiţi precum şi ordinea în care aceştia sunt adăugaţi. În general, reacţiile încep prin adăugarea fie a enzimei, fie a substratului la amestecurile de determinat care au atins temperatura optimă de reacţie. Este preferabilă prepararea aşa numitor "amestecuri cocktail" pentru determinarea enzimei. Aceste amestecuri conţin toţi reactivii stabili, care pot fi amestecaţi şi păstraţi împreună. Aceste amestecuri fac ca în toate determinările să se utilizeze exact aceeaşi concentraţie, eliminându-se astfel o seie de erori (cum sunt cele de pipetare). Trebuie ca, prin procedeul şi tehnicile utilizate în cadrul unei determinări enzimatice să se elimine posibilitatea denaturării enzimei.

3.5.1.3 *Unităţi enzimatice*

Analiza activităţii unei enzime se numeşte *determinare*. Rezultatele obţinute prin determinări enzimatice nu sunt în termeni de greutate ale enzimei, ci în unităţi ale activităţii catalitice.

Spre deosebire de reactivii analitici organici şi anorganici care au o puritate cuprinsă între 90-100%, puritatea majorităţii enzimelor variază, ele neputând să fie obţinute într-o stare de puritate analitică. De aceea, în cazul enzimelor este esenţială definirea unei unităţi arbitrare prin care să se poată exprima cantitativ activitatea şi puritatea acesteia. Pentru descrierea experienţelor de cinetică enzimatică şi a activităţii enzimelor sunt utilizate definiţii şi unităţi standard.

Enzima trebuie determinată calitativ prin reacţia pe care o catalizează şi cantitativ prin viteza reacţiei respective.

Unităţi arbitrare

Concentraţia enzimei este de obicei exprimată prin unităţi enzimatice. Unitatea enzimatică este legată într-un mod arbitrar de viteza reacţiei catalizate de enzimă. De exemplu, unitatea pentru lipaza fungică poate fi definită ca fiind "cantitatea de enzimă care va produce acizi graşi echivalentă cu 1 ml soluţie de KOH 0,05 n, în condiţii experimentale date"(substratul este uleiul de măsline 15%, timp de reacţie 150 min., pH=5,6, temperatura 30^0 C). Definiţia este arbitrară deoarece condiţiile de lucru pot varia sau diferi (normalităţi, timpi de reacţie, temperatură). În majoritatea cazurilor un autor alege o definiţie pe care a găsit-o adecvată studiului său particular şi care poate varia mult faţă de cea a altor autori.

La ora actuală, există o varietate de definiţii ale unitatilor enzimatice deoarece există o multitudine de metode pentru determinarea enzimelor individuale. Acest fapt

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

este generat de necesitatea ca definiţia unităţilor enzimatice să fie bazată pe condiţiile experimentale care să reflecte folosirea practică a enzimei. De exemplu unităţile unei amilaze pot fi definite în funcţie procesul în care aceasta este folosită; acestea se vor definii în termenii zaharurilor reducătoare formate sau al vâscozităţii pastelor de amidon atunci când enzima eate folosită în producerea siropului de fructe, sau respectiv la solubilizarea amidonului.

Unităţi oficiale

Din nefericire au fost propuse multe unităţi diferite pentru aceeaşi enzimă determinată prin metode diferite. Pentru a înlătura confuziile care pot apărea, au fost făcute diferite încercări pentru standardizarea unităţilor enzimatice.

În vara anului 1959, Comisia de Enzime a Uniunii de Biochimie şi a Comisiei de Chimie Clinică, a Uniunii Internaţionale de Chimie Pură şi Aplicată a acceptat adoptarea unei unităţi internaţionale [9]. Acestă unitate este definită ca reprezentând acea cantitate de enzimă care duce la transformarea 1 μmol de substrat /min /25^{0}C sau 30^{0}C la concentraţie de substrat, tărie ionică a tamponului şi pH optime. Includerea concentraţiei de substrat în definiţie este esenţială pentru cazul enzimelor care experimental nu pot fi saturate cu substrat (ex. catalaza).

La propunerea Comisiei de Enzime a Uniunii Internaţionale de Biochimie în anul 1961 – o unitate a activităţii enzimatice a fost definită ca fiind cantitatea de enzimă care catalizează transformarea 1 μmol de substrat /min în condiţii definite.

Dacă substratul este un polimer, ca de exemplu o proteină sau pectină, atunci în locul "1 μmol de substrat " trebuie utilizat "1 μ echivalent al grupei implicate". Aceasta înseamnă că, în cazul proteinelor unitatea enzimatică a protează se va baza pe echivalenţi de grupări carboxil libere (sau amino libere) formate per minut.

Trebuie realizat faptul că unitatea enzimatică, nu poate fi definită astfel atunci când determinarea enzimei este bazată pe un test fizic, cum ar fi vâscozittatea unei paste de amidon sau pe determinarea proteinei reziduale care poate fi precipitată cu acid. În astfel de cazuri numărul de legături hidrolizate în reacţie rămân necunoscute.

Comisia de Nomenclatură Biochimică a recomandat ca activitatea enzimatică (A.E.) să fie raportată în Katali; 1 katal reprezintă cantitatea de enzimă care transformă 1 mol de substrat/sec (= 6 x 10^7 μmol/min). Katalul, nu a fost încă adoptat de enzimologi. În locul Katalului se mai foloseşte μkatalul. Deci, toate valorile vitezei de reacţie (v_0) trebuie exprimate în μmoli de produs format (sau substrat transformat) / min.

Prin intermediul Unităilor Internaţionale preparatele enzimatice obţinute din surse diferite pot fi comparate din punctul de vedere al activităţii enzimatice.

Activitatea specifică a unui preparat enzimatic exprimată ca numărul de unităţi enzimatice/mg proteină (enzimă) şi permite calcularea purităţii acestuia dacă se cunoaşte activitatea specifică a enzimei pure sau a unui preparat pur. De exemplu activitatea specifică a unui preparat fungic de α-amilază pură este de circa 5.000 unităţi enzimatice/mg. Un preparat fungic de α-amilază comercială are aproximativ 5 unităţi α-amilazice/mg, deci puritatea preparatului comercial va fi de 0,1 %.

Gradul purificării unei enzime este dat de raportul raportul dintre activitatea specifică a enzimei purificate şi cea a preparatului enzimatic neprelucrat (brut).

Dacă se cunoaşte greutatea molară a unei enzime, activitatea ei poate fi exprimată ca activitate moleculară. Aceasta este definită ca număr de unităţi/μmol de enzimă, la o concentraţie optimă de substrat, ceea ce reprezintă numărul de molecule

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de substrat transformate/minut/moleculă de enzimă sau μmoli de substrat transformat în produs/μmol enzimă/minut. Activitatea molară (sau moleculară) mai poate fi definită ca număr de katali/mol de enzimă. Aceasta expresie particulară a activității enzimatice a fost denumită deseori număr de turnover. In prezent se preferă termenul de activitate moleculară, deoarece numărul de turnover a fost folosit în sensuri diferite. Activitatea moleculară este o caracteristică a enzimelor individuale şi nu reflectă puritatea preparatului enzimatic.

Activitatea catalitică a unei enzime pure este exprimată deseori şi ca numărul ei de turnover sau constanta catalitică. Această valoare cu dimensiunea min^{-1} reprezintă numărul evenimentelor catalitice care apar/min., adică numărul μmoli de substrat transformat în produs/min./μmol de enzimă.

Activitatea centrului catalitic (care este tot o măsură a activității enzimatice) se defineşte ca fiind numărul de molecule de substrat transformate în produşi/min./centru catalitic al enzimei.

Determinarea activității enzimelor prezintă importanţă în controlul proceselor de biosinteză a enzimelor, în procesele de izolare şi purificare a acestora, şn construcţia biosensorilor precum şi în determinarea cantității corectă de enzimă care trebuie adăugată într-un produs comercial.

3.6. DETERMINAREA SUBSTRATELOR

Enzimele, datorită specificității lor prezintă importanţă în determinările analitice ale unor compuşi chimici de importanţă chimică, biochimică, clinică, medicală, alimentară şi al unor poluanţi. In prezent există un număr mare de enzime comerciale, de diferite grade de puritate la un cost de preţ rezonabil (ţinând cont şi de faptul că în determinările enzimatice se folosesc cantităţi mici de enzimă).

Concentraţia unui reactant care participă într-o reacţie enzimatică poate fi calculată în două moduri:

- prin măsurarea modificării totale care rezultă, care se poate reliza printr-o analiză chimică, fizică sau enzimatică a produsului sau a reactantului nereacţionat, sau
- din viteza reacţiei enzimatice care depinde de concentraţia substratului coenzimei, activatorului sau inhibitorului.

La o concentraţie fixă de enzimă, viteza iniţială a unei reacţii enzimatice creşte odată cu creşterea concentraţiei de substrat până când se atinge un exces care nu limitează viteza, dar după care, la adăugarea încontinuare de substrat nu mai conduce la creşterea vizibilă a vitezei. Regiunea în care se obţine linearitatea dintre viteza de reacţie şi concentraţia de substrat şi în care o determinare analitică a concentraţiei de substrat bazată pe viteza de reacţie poate fi efectuată, se află la valori mai mici deât 0,2 K_m.

3.6.1. METODA MODIFICĂRII TOTALE SAU A ECHILIBRULUI.

În cadrul acestei metode se folosesc cantităţi mari de enzimă şi cantităţi mici de substrat pentru a asigura o reacţie relativ rapidă. Reacţia este lăsată să decurgă total şi cantitatea de substrat din probă poate fi calculată din cantitatea de produs formată. Spre sfârşitul reacţiei concentraţia de substrat va fi foarte mică şi timpul necesar atingerii echilibrului va fi relativ mare. Raportul V_{max}/K_m este util în determinarea concentraţiei de enzimă necesară, în acest sens fiind recomandate valori ale raportului

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

egale cu 1; în aceste condiţii timpul de reacţie este puţin mai mare decât 3 minute presupunînd concentraţia de substrat utilizată ca fiind mai mică decât valoarea K_m , timp în care se obţine o transformare de aproximativ 99% a substratului. Produsul de reacţie trebuie să fie într-un mod oarecare chimic sau fizic diferit de substratul de determinat; de exemplu etanolul poate fi determinat printr-o reacţie enzimatică catalizată de alcool-dehidrogenază:

$$\text{etanol} + NAD^+ \xrightarrow[\text{dehidrogenază}]{\text{alcool}} \text{acetaldehidă} + NADH + H^+$$

Reacţia poate fi urmărită spectrometric prin măsurarea creşterii concentraţiei formei reduse a NAD-ului şi anume NADH, care prezintă o absorbţie puternică la 340 nm, domeniu în care NAD^+ nu absoarbe. Cantitatea totală de NADH rezultată reprezintă deci o măsură a cantităţii iniţiale de etanol prezentă în probă.

Există puţine reacţii care decurg spre echilibru iar relativ la cantitatea de enzimă folosită aceasta nu influenţează poziţia acestuia. În cadrul determinărilor cantitative directe este important ca reacţia să decurgă aproape total lucru care se poate realiza pe diverse căi. Poziţia de echilibru poate fi modificată prin modificarea pH-ului la o valoare cât mai depărtată de valoarea pH-ului optim al enzimei. De exemplu, poziţia echilibrului pentru reacţia catalizată de lactat dehidrogenază în care are loc transformarea piruvatului în lactat este mult deplasată spre formarea piruvatului la pH = 7,6 şi spre lactat la pH = 9,0.

Deasemenea, poate fi folosită şi o reacţie cuplată care să indice cantitatea de substrat transformată în produs. Un exemplu în acest sens îl constituie determinarea glucozei, prin utilizarea glucoz-oxidazei, din reacţie rezultând H_2O_2. Gradul de avansare al reacţiei poate fi determinat urmărindu-se scăderea concentraţiei de oxigen din mediu folosind un sensor pentru oxigen sau, mult mai uşor cu ajutorul unei reacţii cuplate cu prima (reacţie indicatoare) care conduce la formarea unui produs de reacţie colorat dintr-un compus necolorat (ex. o-dianisidina).

Reacţie enzimatică:

$$\text{Glucoza} + H_2O + O_2 \xrightarrow{GOD} \text{Acid gluconic} + H_2O_2$$

Reactie indicatoare

$$H_2O_2 + \text{compus necolorat} \xrightarrow{POD} H_2O + \text{compus colorat}$$

Intensitatea totală a culorii compusului rezultat este o măsură a concentraţiei de glucoză prezentă.

În cadrul reacţiilor implicând două sau trei substrate folosirea unor concentraţii mari pentru cel de al doilea sau al treilea substrat deplasează echilibrul reacţiei de testat spre formarea produsului iar utilizarea unei a doua reacţii care conduce la regenerarea unuia dintre substratele iniţiale din produţii rezultaţi conduce deasemenea la transformarea substratului de determinat (testat).Determinarea glutamatului, de exemplu, poate fi realizată prin intermediul unei reacţii catalizate de glutamat dehidrogenaza, reacţie în urma careia se formează oxoglutaratul; reacţia poate decurge aproape total prin utilizarea unei a doua enzime şi anume lactat dehidrogenaza care coduce la regenerarea NAD^+ utilizat în cadrul reacţiei test (figura 3.13). Cantitatea de oxoglutatra formată poate fi determinată şi pe această bază poate fi calculată în mod indirect cantitatea iniţială de glutamat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Metoda echilibrului se poate apica şi în cazul sistemelor enzimatice cuplate în cadrul cărora produsul reacţiei test generează substrate pentru reacţiile auxiliare şi indicatoare.

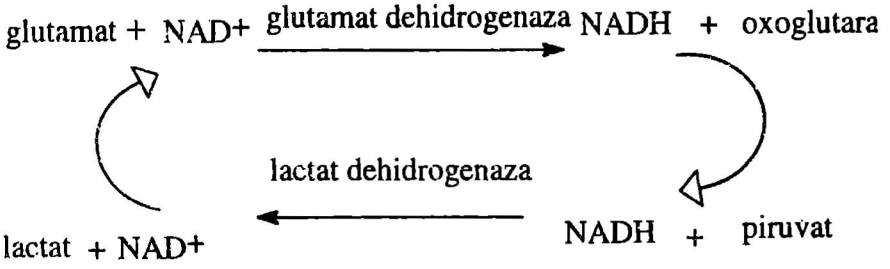
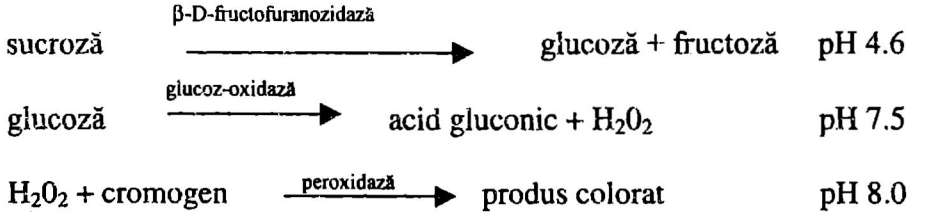


Fig. 3.13 Reformarea NAD^+ în reacţia de determinare a L-glutamatului

Alegerea pH-ului este mai puţin critică decât în cazul determinării enzimelor, în general fiind utilizată o valoare de pH de compromis, fiind folosită totodată o cantitate în exces de enzimă pentru a compensa pierderea din activitate. Deasemenea, reacţia poate decurge total în două etape de reacţie, modificând pH-ul pentru fiecare etapă în parte. De exemplu, determinarea cantitativă a sucrozei folosind invertaza (EC 3.2.1.26) şi glucoz-oxidaza (EC1.1.3.4), poate fi realizată permiţând fructofuranozidazei să acţioneze la un pH=4,6 iar după o anumită perioadă de timp modificând pH-ul la 7,5 pentru ca cea de a doua etapă de reacţie să decurgă total:



Cicluri enzimatice

Substratele existente în concentraţii foarte mici pot fi determinate prin reformarea substratului de determinat (test) pe o perioadă apreciabilă şi definită de timp, măsurându-se cantitatea de produs format. De exemplu, coenzima NADPH, poate fi determinată folosind două enzime: glutamat dehdrogenaza (EC 1.4.1.3) şi glucoz-6-fosfat dehidrogenaza (EC 1.1.1.49):

$$NADPH + oxoglutarat + NH_3 = NADP^+ + L\text{-glutamat}$$

$$NADP^+ + glucoz\text{-}6\text{-}fosfat = NADPH + 6\text{-}fosfogluconat$$

Amestecul de reacţie conţine oxoglutaratul, amoniacul, glucozo-6-fosfatul şi cele două enzime. Reacţia se iniţiază prin adăugarea substratului de determinat (NADPH) şi lăsată să decurgă o perioadă definită de timp. Reacţia se stopează prin inactivarea enzimelor iar cantitatea de 6-fosfogluconat acumulată se determină printr-o metodă adecvată fiind ulterior corelată cu cantitatea iniţială de NADPH existentă în probă. În acest caz produsul poate fi determinat folosind glucozo-6-fosfat dehidrogenaza şi urmărindu-se oxidarea NADPH-ului aflat exces. Astfel de metode necesită o calibrare folosind cantităţi cunoscute de substrat de testat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3.6.2. METODA CINETICĂ

În metoda cinetică viteza inițială a reacției, v_0, este măsurată printr-unul din modurile convenționale, prin urmărirea fie a dispariției substratului, fie a obținerii produsului. Viteza este funcție de concentrația de substrat (S), enzima (E), inhibitor (I) și activator (A). De exemplu, concentrația de glucoză poate fi determinată măsurând viteza inițială a producerii colorantului din exemplul de mai sus.

Deoarece enzima este un catalizator ea afectând deci viteza de reacție și nu echilibrul unei reacții, activitatea ei trebuie determinată printr-o metodă cinetică (sau de viteză) sau printr-o titrare directă a centrului activ. Deasemenea, activatorii sau inhibitorii care afectează capacitatea catalitică a enzimelor pot fi măsurați numai prin metode cinetice. Substratele pot fi determinate fie prin metoda echilibrului fie prin metoda cinetică; precizia ambelor metode este comparabilă.

Metoda cinetică de determinare a substratelor este asemănătoare cu cea a determinării enzimelor, dar este mai puțin utilizată datorită dificultății măsurării vitezei de dispariție a substratului la concentrții mici ale acestuia.

Determinările cinetice au fost utilizate și în cadrul sistemelor cuplate în care concentrația de substrat este menținută constantă printr-un proces de reciclare. In astfel de cazuri viteza reacției indicatoare va rămâne deasemenea constantă și poate fi corelată cu concentrația inițială de substrat. Cantități mici de NAD^+ pot fi determinate prin cuplarea reducerii acestuia la NADH cu reducerea simultană a citocromului c, proces care poate fi urmărit la o lungime de undă de 550 nm (figura 3.14).

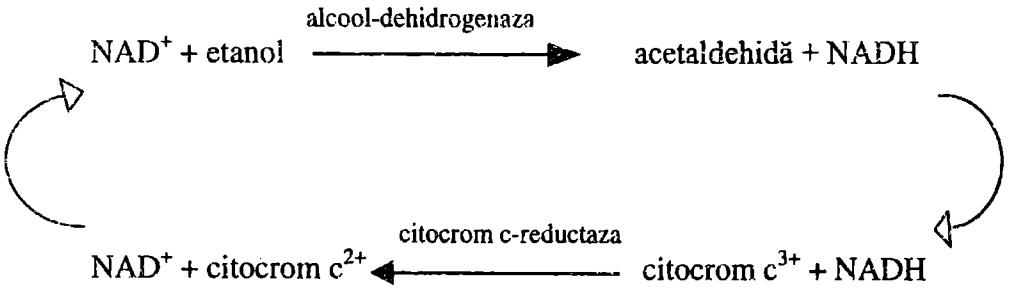


Fig. 3.14 Determinarea cinetică a NAD^+. Viteza de creștere a absorbanței la 550 nm datorată reducerii citocromului c poate fi corelată cu concentrația NAD^+ corespunzătoare stării staționare.

Amestecul de reacție conține etanol și citocrom c, împreună cu enzimele alcool dehidrogenaza (EC 1.1.1. 1) și citocrom c reductaza (EC 1.6.99.3). Odată cu inițierea reacției prin adăugare de NAD^+, apare o stare staționară în care viteza de reducere a citocromului c poate fi corelată cu concentrația de NAD^+.

Viteza reacției este influențată de condițiile de pH, temperatură și tărie ionică și pentru a obține rezultate reproductibile, toți acești factori trebuiesc controlați în mod riguros. Guilbault și Pardue au arătat că lucrând cu precauție se pot obține rezultate cu o precizie mai mare de 1% . Mai mult, prin metodele de viteză pot fi preântâmpinate unele dificultăți relative la reacțiile secundare și în multe cazuri pot fi obținute sensibilități mari [8].

Există diferite metode posibile pentru a calcula viteza unei reacții enzimatice și anume: metoda pantei inițiale, metoda concentrației fixe sau a timpului variabil și metoda timpului fix. Toate cele trei metode pot fi automatizate. Aceste metode nu vor fi tratate în acest capitol.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

4. APLICAȚIILE BIOANALITICE ALE REACȚIILOR ENZIMATICE BAZATE PE INHIBITORI

Un număr mare de poluanți atmosferici sunt reprezentați printr-o serie de compuși care acționează ca inhibitori ai enzimelor și pe această bază au fost realizate o serie de metode de determinare a unor astfel de compuși. Poluanții sunt răspândiți în apă, aer și sol, ei regăsindu-se în deșeurile rezultate din procese industriale, agricole și casnice. Dintre poluanții cu efect inhibitor asupra enzimelor pesticidele și metalele grele au cea mai mare răspândire, acești compuși având efecte toxice asupra organismului uman influențând totodată și funcționarea ecosistemului. O parte din acești inhibitori și enzimele asupra cărora acționează sunt redate în tabelul 4.1.

Tab. 4.1 Grupele principale de inhibitori și enzimele asupra cărora acționează[10]

Inhibitor	Enzima
Pesticide:	
Insecticide: (organofosforice și carbamate)	Colinesteraza, alcalin fosfataza, fosfataza acidă, acilaza, lipaza, chimotripsina
Erbicide (sulfoniluree, triazaine)	Tirozinaza, acetolactat sintetaza, peroxidaza
Fungicide (ditiocarbamate)	Aldehid dehidrogenaza, tirozinaza
Metale grele:	
Beriliu	Alcalin fosfataza
Cadmiu	Colinesteraza, G-3-PDH, L-LDH, LAP
Crom	L-LDH, G-6-PDH, colinesteraza, piruvat kinaza, hexokinaza
Cobalt	Ureaza
Cupru	L-LDH, ureaza, GOD, colinesteraza, fosfataza acidă
Plumb	Fosfataza alcalină, L-LDH
Mercur	Ureaza, GOD, colinesteraza, fosfataza acidă, piruvat oxidaza, L-LDH, invertaza, L-glicerofosfat oxidaza
Argint	L-LDH, GOD, ureaza
Zinc	L-LDH

G-3-PDH: glicerol-3-fosfat dehidrogenaza; L-LDH: L-lactat dehidrogenaza; GOD: glucoz oxidaza; LAP: leucin aminopeptidaza; G-6-PDH: glucozo-6-dehidrogenaza;

Una dintre cele mai studiate enzime este colinesteraza care este inhibată de insecticidele organofosforice și carbamate precum și de o serie de metale grele. Metodele spectrometrice sunt cel mai adesea folosite în determinarea inhibitorilor. Aceste metode folosesc enzima în soluție, astfel încât biocatalizatorul nu poate fi refolosit ceeace conduce la o creștere a prețului de analiză. Tehnicile bazate pe biosensori prezintă avantajul că folosesc enzima imobilizată permițând astfel folosirea repetitivă a enzimei.

Inhibarea anumitor reacții de către o serie de substanțe care pot fi produși ai reacțiilor respective sau, a unor reacții ulterioare reprezintă baza mecanismului de control a metabolismului celular, în timp ce inhibarea selectivă a enzimelor formează baza pentru o serie de procese chemoterapeutice sau farmacodinamice.

Definită în termeni biochimici de către Peters, inibiția unei enzime presupune scăderea vitezei reacției catalizate de aceasta. Clasificarea reacțiilor de inhibiție enzimatică are la bază

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

interacția dintre inhibitori cu principalele componente ale sistemului enzimatic şi anume cu: enzima, substratul, coenzima, activatorul, complexul enzimatic şi cu alte componente din sistem. Cu toate că unii inhibitori acționează asupra substratelor sau cofactorilor discuția se va restrânge numai la acei inhibitori care se combină direct cu enzima.

În prima parte a acestui capitol se va trata inhibiția enzimelor în soluție. În acest scop se vor prezenta o serie de aspecte teoretice legate de inhibiție, urmate de ecuațiile cinetice ale reacțiilor de inhibiție din soluție precum şi de metodele cinetice de determinare a inhibitorilor enzimelor solubile şi imobilizate.

4.1. INHIBIȚIA ÎN SOLUȚIE

Inhibitorii enzimatici sunt substanțe care determină scăderea vitezei unei reacții catalizate enzimatic, efectul lor fiind tranzitoriu sau permanent; în funcție de modul lor de acțiune chimică inhibitorii sunt împărțiți în două grupe: inhibitori reversibili şi ireversibili. Principalele caracteristici ale diferitelor tipuri de inhibiție sunt redate în tabelul 4.2.

Tab. 4.2 Caracteristicile principale ale inhibiției reversibile şi ireversibile

	Reversibilă	**Ireversibilă**
Reacții Parametrii inhibiției	$E + I \overset{K_i}{\rightleftharpoons} EI$ constanta de disociere (echilibru)	$E + I \overset{k_i}{\rightleftharpoons} [EI] \longrightarrow EI'$ Constanta de viteză bimoleculară k_I
Ecuații	$v_0 = V'_{max}[S]/(K'_m + [S])$ (ecuația Michaelis – Menten) -competitivă: $K'_m = K_m(1+[I]/K_i)$ $V'_{max} = V_{max}$ -noncompetitivă: $K'_m = K_m$ $V'_{max} = V_{max}/(1 + [I]/K_i)$ - Necompetitivă: $K'_m = K_m/(1+[I]/K_i)$ $V'_{max} = V_{max}/(1 + [I]/K_i)$	$\ln(v_0/v_0) = k_i [I] t$ (ecuația Aldridge)
Modul de legare al inhibitorului	Necovalent (ionic, Van der Walls)	Covalent
Modificări ale moleculei de inhibitor după disociere	-	+ (hidroliză, oxidare)
Necesitatea preincubării	-	+
Reactivare	Rapidă, prin procedee de Îndepărtare a inhibitorului prin spălare	Necesită procedee de reactivare speciale

Inhibitorii reversibili, după cum sunt denumiți, se leagă de enzimă într-un mod reversibil, aceasta recăpătându-şi activitatea enzimatică după ce inhibitorul este înlăturat prin dializă sau simpla diluție a probei. Inhibitorii reversibili determină o inhibiție progresivă, formând rapid un sistem de echilibru cu enzima, rezultând un grad bine definit de inhibiție care este funcție de concentrația de enzimă, de concentrația de substrat şi de concentrația de inhibitor şi care rămâne constant pe toată perioada vitezei inițiale în care se efectuează măsurătorile.

În cazul inhibiției ireversibile, enzima nu-şi mai recapătă activitatea catalitică, inhibitorii neputând fi îndepărtați de pe suprafața enzimei prin dializă. Un inhibitor ireversibil poate fi îndepărtat de pe suprafața enzimei, prin introducerea unui alt component în amestecul de reacție,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

dar aceasta nu afectează clasificarea inițială. Inhibitorii ireversibili determină o inhibiție progresivă care depinde de creșterea concentrației de inhibitor, ea devenind totală la o concentrație suficient de mare de inhibitor pentru a se combina cu întreaga cantitate de enzimă prezentă. Spre deosebire de inhibitorii reversibili, gradul de inhibiție se poate modifica (crește) pe perioada vitezei inițiale în care se efectuează măsurătorile.

Trebuie specificat faptul că substratul trebuie să fie prezent în toate cazurile de determinare enzimatică a inhibitorilor. În cele mai multe cazuri, cantitatea de substrat utilizată este suficient de mare astfel încât viteza reacției neinhibate poate fi considerată ca fiind nemodificată și folosită drept punct de referință. Printre parametrii care influențiază procesul de inhibiție, unul dintre cei mai importanți este pH-ul, care trebuie selectat corespunzător deoarece interacția dintre enzimă și inhibitor este pH-dependentă.

În capitolul de față discuția relativă la inhibiție se va restrânge la reacțiile enzimatice implicând un un singur substrat și care se supune cineticii Michaelis-Menten.

4.1.1 INHIBIȚIA REVERSIBILĂ

Inhibiția competitivă se caracterizează printr-un echilibru între enzimă și inhibitor caracterizat printr-o constantă de echilibru K_i (constanta de disociere a complexului enzimă-inhibitor, $K_i = [E]\,[I]/\,[EI]$, unde [E] și [I] reprezintă concentrațiile de enzimă și respectiv de inhibitor) care redă afinitatea enzimei pentru inhibitor. Reversibilitatea inhibiției presupune faptul că nu este necesară o incubare prealabilă a enzimei cu inhibitorul. Funcție de comportarea inhibitorului față de centrul activ al enzimei există trei tipuri principale de inhibiție reversibilă: competitivă, necompetitivă și non-competitivă. Odată cu apariția procesului de inhibiție expresia vitezei de reacție enzimatică se modifică cu termenul $(1 + [I]/K_i)$ care afectează fie viteza maximă (V_{max}) –inhibiția non-competitivă-, sau constanta de afinitate K_m (inhibiția competitivă) sau ambii parametrii (inhibiția necompetitivă) – a se vedea tabelul 4.2. După cum se va demosnstra în continuare, considerându-se graficul Lineweaver-Burk, ficare tip de inhibiție poate fi determinată în funcție de modificările pantei K_m/V_{max}, și a intersecțiilor cu axa $1/[S]$ $(-1/K_m)$ și/sau cu axa $1/v$ $(1/V_{max})$.

4.1.1.1 *Inhibiția competitivă*

Inhibiția competitivă este o inhibiție reversibilă. În principiu, se consideră inhibitori competitivi acei componenți care reacționează reversibil cu centrul activ al enzimei ale cărei reacții le inhibă, concurând în mod egal pentru acesta cu substratul specific cu care adesea seamană ca structură; aceștia se leagă de enzime dar nu sunt transformați în produși de reacție. In această situație se formează un complex inactiv, și pentru ca reacția enzimatică să decurgă la nivelul centrului activ inhibitorul trebuie să disocieze de la nivelul acestuia fiind înlocuit de moleculele de substrat. Acest tip de inhibiție apare atunci când inhibitorul și substratul se exclud reciproc astfel încât legarea unui dintre aceștia exclude posibilitatea legării celuilalt. În literatură există modele mult mai complexe relative la acest tip de inhibiție care nu sunt luate în discuție (figura 4.1). În toate aceste cazuri, gradul de inhibiție scade odată cu creșterea concentrației de substrat și deci inhibiția este reversibilă odată cu creșterea concentrației de substart. Datorită faptului că formarea complexului dintre enzimă și inhibitor este o reacție reversibilă inhibitorul poate fi îndepărtat prin creșterea concentrației substratului specific.

După cum s-a menționat, inhibitorii competitivi au în general o structură similară cu cea a substratelor cu care intră în competiție față de același centru activ de legare al enzimei, ei blocând astfel anumite grupări reactive de pe suprafața enzimei. Un exemplu în acest este reprezentat de malonat care este un inhibitor competitiv al reacției catalizate de succinat dehidrogenază (figura 4.2). Malonatul prezintă două grupe carboxilice, ca și substratul specific (succinatul) și se poate

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

lega de centrul activ al enzimei. Reacţia ulterioară presupune formarea unei duble legături şi deoarece malonatul spre deosebire de succinat are un singur atom de carbon între cele două grupări carboxilice acesta nu poate reacţiona. Alt exemplu clasic pentru inhibitorii reversibili îl reprezintă acţiunea unor medicamente terapeutice (antibiotice) din clasa sulfamidelor care prezintă similarităţi structurale cu substratul natural acidul p-aminobenzoic (figura 4.3).

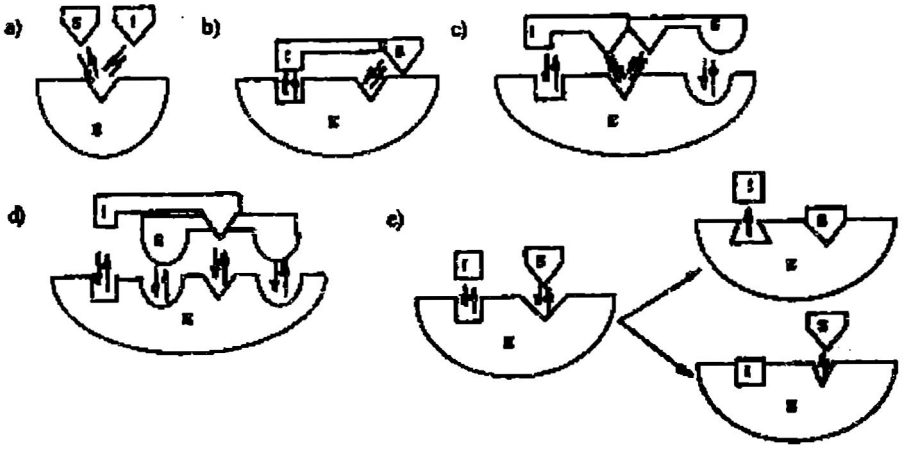


Fig. 4.1 Modele de inhibiţie competitivă: a) S şi I sunt în competiţie pentru acelaşi centru de legare; b) împiedicări de ordin steric nu permit legarea I şi S; c) I şi S împart acelaşi centru de legare; d) centrele de legare ale lui I şi S sunt diferite dar se suprapun; e) legarea ligandului modifică conformaţia centrului de fixare pentru cel de al doilea ligand [3].

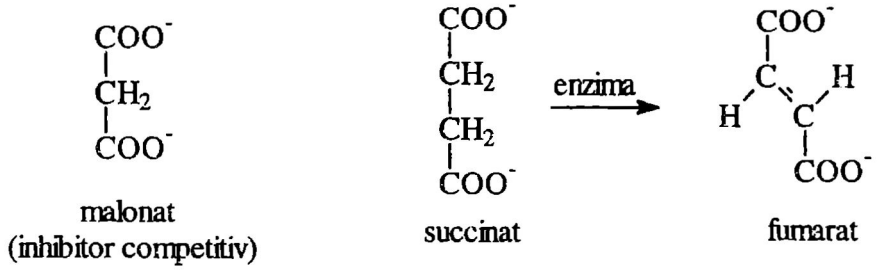


Fig. 4.2 Inhibitori competitivi având o structură similară cu a substratului specific

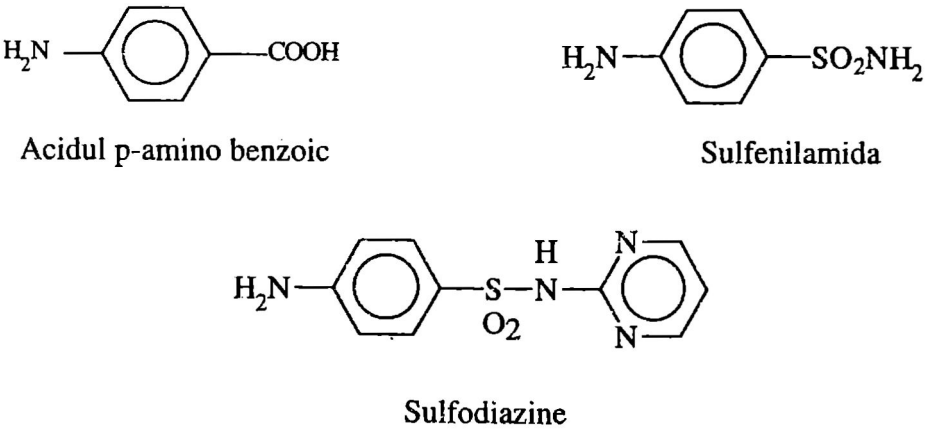


Fig. 4.3 Inhibiţia competitivă. Sulfamidele intră în competiţie cu acidul p-aminobenzoic care reprezintă un factor esenţial de creştere pentru majoritatea bacteriilor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Efectul inhibiției competitive este funcție de concentrațiile relative ale inhibitorului și ale substratului și de afinitatea inhibitorului și a substratului față de enzimă. În general, la o concentrație mică de substrat și la o anumită concentrație de inhibitor și de enzimă, inhibitorul va concura favorabil cu substratul pentru centrul activ al enzimei și gradul de inhibiție va fi mare. Dacă la aceiași concentrație de inhibitor și de enzimă, concentrația substatului este mare, inhibitorul va fi mai puțin favorizat în competiție cu substratul pentru centrul de legare disponibil și gradul de inhibiție va fi mai mic. La o concentrație foarte mare de substrat, moleculele de substrat vor depăși cu mult numărul moleculelor de inhibitor și gradul de inhibiție va fi neglijabil. In acest caz viteza maximă (V_{max}) a reacției rămâne nemodificată (figura 4.4) iar ca rezultat al inhibiției constanta aparentă K_m crește.

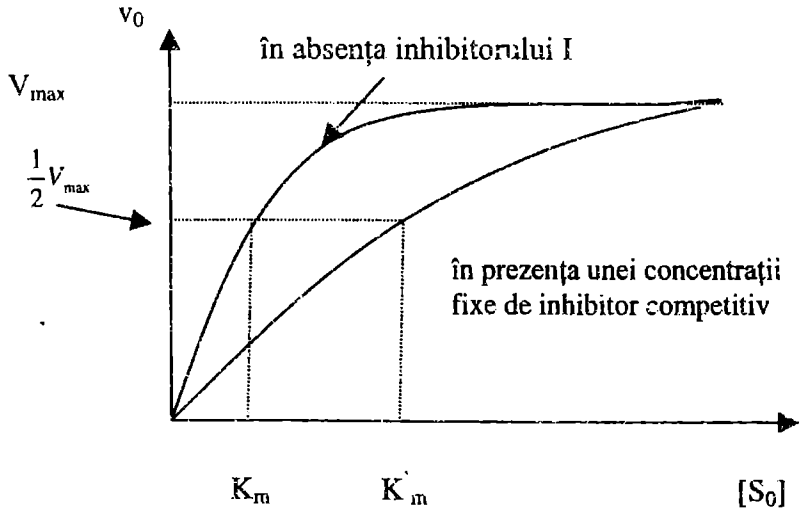


Fig. 4.4 Graficul Michaelis-Menten redând efectul unui inhibitor competitiv (la $[E_0]$ fixă) .

În cele ce urmează, se vor deduce ecuațiile cinetice corespunzătoare stării staționare, pentru o reacție cu un singur substrat, un singur centru de legare, un singur intermediar de reacție, în prezența inhibitorului competitiv I. Pentru aceasta se consideră secvența de reacții:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P \qquad (4.1)$$

$$+ I \uparrow\downarrow K_i \quad EI \qquad (4.2)$$

Constanta de disociere pentru reacția (4.2) este dată relația:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}, \qquad (4.3)$$

unde K_i= constanta de inhibiție.

Echilibrul dintre inhibitor și enzimă se stabilește instantaneu la scurt timp după amestecarea acestora. Plecând de la una din relațiile prin se poate deduce ecuația vitezei inițiale în ipoteza teoriei stării staționare și anume:

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{+1}}{k_{+1}} = K_m \qquad (4.4)$$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

şi tinându-se cont de expresia concentraţiei iniţiale de enzimă:

$$[E_0]=[E]+[ES]+[EI] \tag{4.5}$$

în care se efectuează substituţia corespunzătoare concentraţiei de [EI] din relaţia 4.3, rezultă:

$$[E_0]=[E]+[ES]+\frac{[E]\circ[I]}{K_i} \tag{4.6}$$

$$[E_0]=[E]\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)+[ES] \tag{4.7}$$

Din relaţia 4.7 se poate exprima [E]:

$$[E]=\frac{[E_0]-[ES]}{1+\frac{[I]}{K_i}} \tag{4.8}$$

care întrodusă în relaţia 4.4, conduce la relaţia:

$$\frac{([E_0]-[ES])[S]}{\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)[ES]}=K_m \tag{4.9}$$

de unde:

$$\frac{([E_0]-[ES])[S]}{[ES]}=K_m\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right) \tag{4.10}$$

Tinându-se cont de faptul că viteza iniţială este dată de relaţia:

$$v_0=k_{+2}\cdot[ES] \tag{4.11}$$

şi înlocuind [ES] explicitată din relaţia 4.10, în relaţia 4.11 se obţine:

$$[E_o][S]=[ES]\left[[S]+K_m\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)\right] \tag{4.12}$$

$$[ES]=\frac{[E_0][S]}{\underbrace{K_m\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)}_{K'_m}+[S]} \tag{4.13}$$

$$\Rightarrow \qquad v_o=\frac{V_{max}[S]}{K_m\left(1+\frac{[I_0]}{K_i}\right)+[S]} \tag{4.14}$$

Ecuaţia (4.14) este similară cu ecuaţia Michaelis-Menten cu diferenţa că valoarea de K_m se modifică (creşte) cu factorul $(1+[I_0]/K_i)$. Trebuie menţionat faptul că inhibitorul se găseşte într-o

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

concentrație aproximativ egală cu cea a substratului, astfel încât se poate afirma că $[I] \cong [I_0]$ așa cum s-a presupus că $[S] \cong [S_0]$. Deci pentru cazul inhibiției competitive se poate afirma că V_{max} rămâne nemodificată, iar K_m se modifică, putându-se introduce notația $K'_m = K_m (1 + ([I_0]/K_i)$, unde K'_m reprezintă constanta K_m aparentă în prezența unei concentrații inițiale de inhibitor competitiv $[I_0]$. În situția în care $K_i = [I_0]$ (și cu condiția că $[I_0] \cong [S_0] >> [E_0]$) se obține: $K'_m = 2K_m$.

Expresia ecuației Lineweaver-Burk în prezența inhibitorului competitiv este dată de relația:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K'_m}{V_{max}} \circ \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (4.15)$$

iar reprezentarea grafică este redată în figurile 4.5 a) și b).

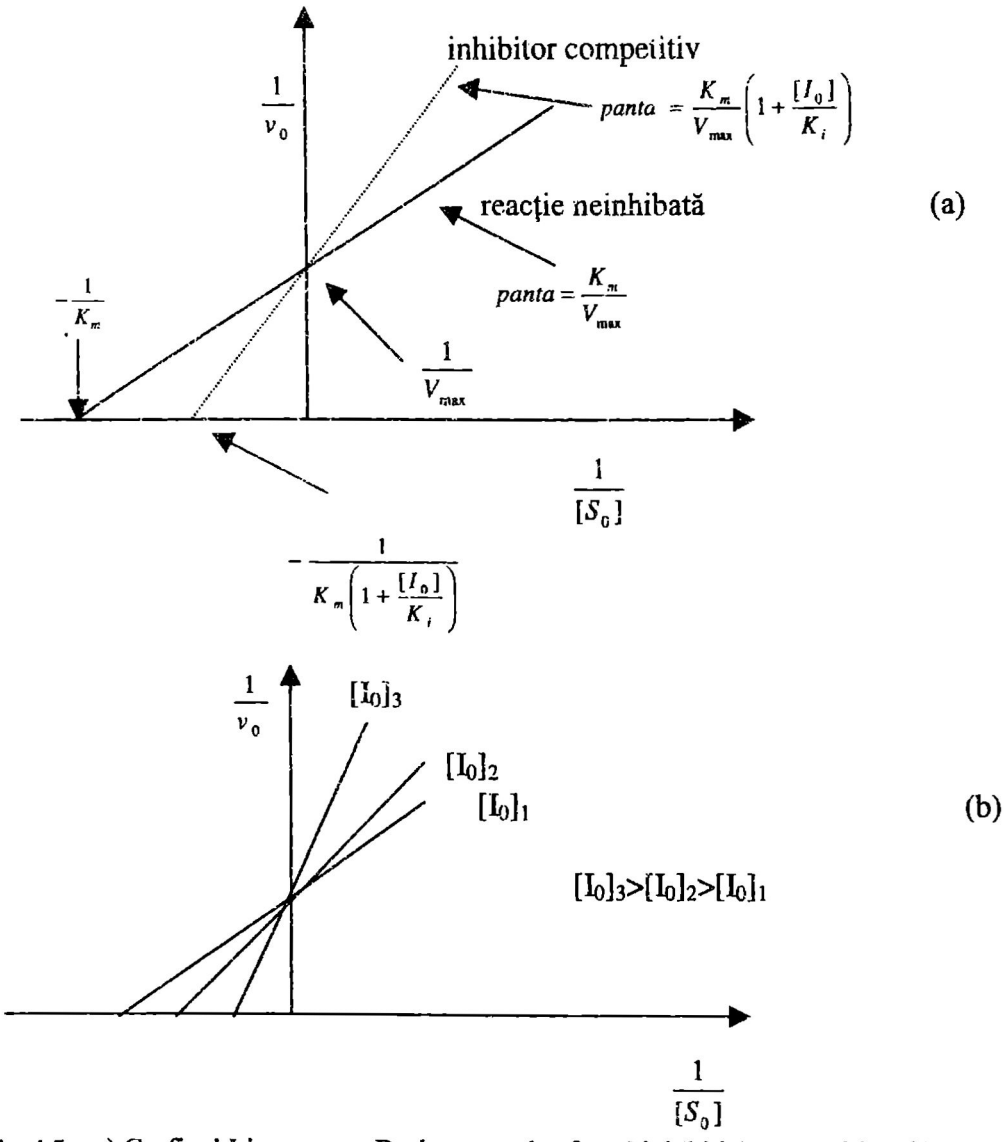


Fig. 4.5 – a) Graficul Lineweaver-Burk care redă efectul inhibiției competitive; b) același grafic pentru diferite concentrații de inhibitor, la o concentrație constantă de enzimă.

Trebuie menționat faptul că o expresie identică se obține și în cazul în care centrul de legare al inhibitorului este separat de cel al substratului, presupunând că legarea substratului de enzimă conduce la blocarea centrului de legare a inhibitorului ca urmare a unor modificări conformaționale sau a altor mecanisme. În acest caz inhibitorul se poate lega de E și nu de ES (cazul discutat mai sus). Din acest motiv, un inhibitor este clasificat drept competitiv, dacă în prezența lui, graficul

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Lineweaver-Burk obţinut conduce la valori diferite ale K_m , valoarea V_{max} rămânând neschimbată, indiferent de mecanismul de reacţie.

Odată stabilit tipul inhibitorului, este de dorit să se determine constanta de inhibiţie K_i care rezultă din expresia (4.16):

$$K'_m = K_m\left(1+\frac{[I_0]}{K_i}\right) \tag{4.16}$$

preferându-se în general o metodă grafică şi nu una numerică (se elimină astfel erorile determinărilor individuale). Ţinându-se cont de expresia de mai sus (4.16), se obţine relaţia:

$$K'_m = \frac{K_m}{K_i} \circ [I_0] + K_m \tag{4.17}$$

Reprezentându-se grafic K'_m (determinat din intersecţia cu axa $1/S_0$ a graficului **primar Lineweaver**-Burk) funcţie de $[I_o]$, se obţine o dreaptă, având intersecţia cu axa $[I_o]$ egală cu $-K_i$ (figura 4.6 a). Deoarece panta graficului Lineweaver-Burk în prezenţa inhibitorului competitiv este K_m/V_{max} $(1+ [I_o]/K_i)$, atunci graficul pantei **primare** (Lineweaver-Burk) funcţie de $[I_o]$ va fi deasemenea linear şi din intersecţia cu axa $[I_o]$ se obţine valoarea $-K_i$ (figura 4.6 b).

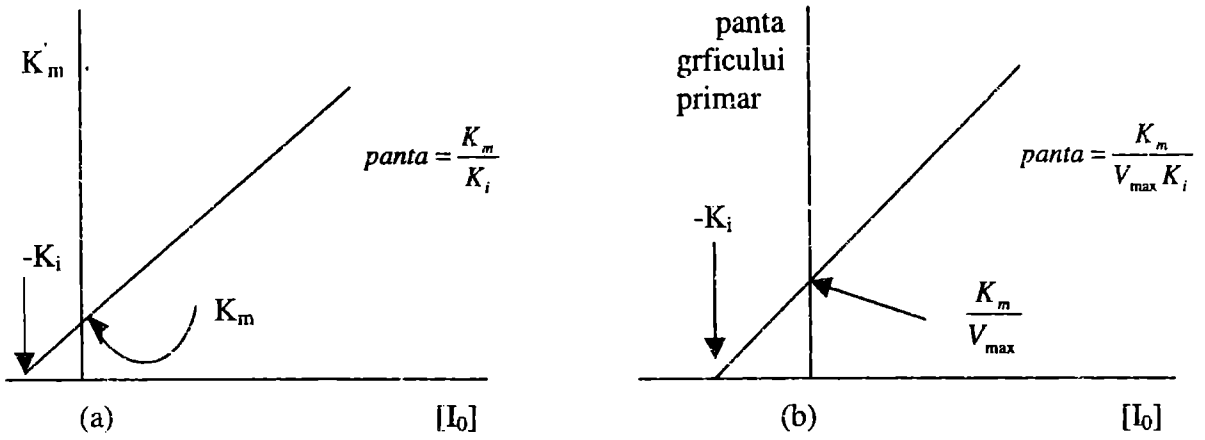


Fig.4.6 Graficele secundare pentru inhibiţia competitivă

Aceste grafice **secundare**, K'_m funcţie de $[I_o]$ şi panta graficului **primar** funcţie de $[I_o]$, se obţin din date cinetice la o concentraţie fixă de enzimă $[E_o]$.

Cazul cel mai simplu de inhibiţie competitivă este uneori numit inhibiţie lineară competitivă deoarece, atât graficele primare cât şi cele secundare sunt lineare. În sisteme mai complicate graficele primare pot fi lineare, dar cele secundare nu mai sunt lineare. De exemplu, dacă nu una, ci două molecule de inhibitor se pot fixa la centrul de legare al substratului, atunci apare o aşa numită inhibiţie competitivă parabolică. Similar, dacă inhibitorul se leagă la un centru diferit de cel de legare a substratului şi reduce afinitatea enzimei pentru substrat fără schimbarea caracteristicilor de reacţie a substratului fixat, atunci rezultă o inhibiţie competitivă hiperbolică. În ambele cazuri graficele primare sunt lineare şi aspectul inhibiţiei nu se deosebeşte de cele ale inhibiţiei competitive lineare.

Inhibitorii competitivi, asemenea altor tipuri de inhibitori, pot fi folosiţi la elucidarea căilor metabolice, în medicină şi în agricultură cu condiţia ca aceştia să nu fie toxici pentru organismele umane. Studii detailate asupra caracteristicilor de legare a diferiţilor inhibitori competitivi la acelaşi centru ca şi substratul natural, pot conduce la obţinerea unor informaţii utile relative la factorii care guvernează legarea substratului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Inhibiţia ureazei de către tiouree reprezintă un exemplu de inhibiţie competitivă care prezintă aplicaţii în controlul poluării mediului, tioureea fiind un produs de degradare al fungicidelor ditiocarbamate.

4.1.1.2 *Inhibiţia necompetitivă*

Inhibitorii necompetitivi sunt reprezentaţi prin acei compuşi care se leagă numai de complexul ES şi nici odată de enzima liberă, generând un complex ESI inactiv. Acest tip de inhibiţie apare numai în cadrul sistemelor enzimatice implicând un singur substrat. În acest caz gradul de inhibiţie va fi dependent numai de concentraţia de inhibitor şi de K_i. Spre deosebire de inhibiţia competitivă gradul de inhibiţie creşte odată cu creşterea concentraţiei de substrat. În cazul unei astfel de inhibiţii legarea substratului de enzimă poate conduce la o modificare conformaţională a structurii enzimei generându-se astfel un centru de legare pentru inhibitor, sau inhibitorul se poate lega direct de complexul ES. În nici unul din cele două cazuri inhibitorul nu concurează cu substratul pentru acelaşi centru de legare, deci inhibiţia nu poate fi îndepărtată prin creşterea concentraţiei de substrat. În cazul inhibitorilor necompetitivi atât valoarea constantei K_m cât şi a vitezei maxime V_{max} se modifică. În figura 4.7 sunt redate diferite modele de inhibiţie necompetitivă.

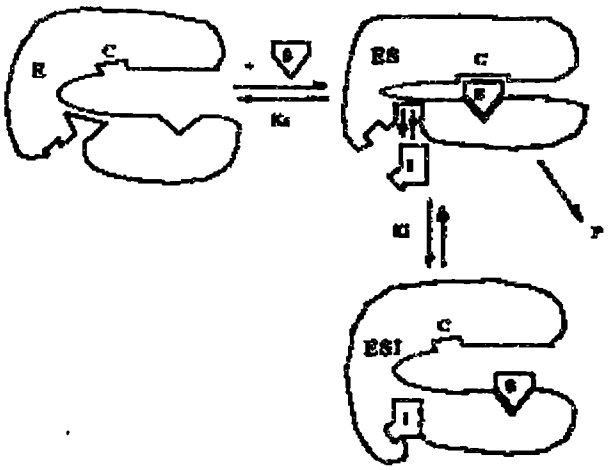


Fig. 4.7 Modele de inhibiţie necompetitivă. I se leagă numai de complexul ES [3].

Ureaza şi acetilcolinesteraza inhibate de ionii de florură reprezintă exemple de inhibiţie necompetitivă. Deasemenea fosfataza alcalină obţinută din intestine de şobolani este inhibată în acest mod de către L-fenilalanină.

Considerându-se din nou reacţiile simple:

$$\begin{array}{ccc} E + S & \rightleftharpoons & ES \rightarrow E + P \\ & & + I \\ & & \updownarrow K_i \\ & & ESI \end{array} \qquad (4.18)$$

unde ESI este un complex inactiv. Echilibrul de mai sus redă faptul că şi în codiţiile unor concentraţii mari de substrat are loc formarea complexului ESI. Constanta de inhibiţie este dată de relaţia:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

$$K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \tag{4.19}$$

În condițiile stării staționare valoarea constantei Michaelis-Menten este dată de relația:

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \tag{4.20}$$

Pentru sistemul de mai sus, concentrația inițială de enzimă este dată de relația:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [ESI] = [E] + [ES] + \frac{[ES][I]}{K_i}$$

$$= [E] + [ES](1 + \frac{[I]}{K_i}) \tag{4.21}$$

de unde:

$$[E] = [E_0] - [ES](1 + \frac{[I]}{K_i}) \tag{4.22}$$

Tinându-se cont de expresia [E] și bazându-ne pe un raționament similar cu cel de mai sus, pentru viteza inițială se obține expresia:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S_0]}{[S_0](1 + \frac{[I_0]}{K_i}) + K_m} \tag{4.23}$$

și împărțind totul la $(1 + \frac{[I_0]}{K_i})$, se obține:

$$v_0 = \frac{\frac{V_{max}}{1 + \frac{[I_0]}{K_i}}[S_0]}{[S_0] + \frac{K_m}{1 + \frac{[I_0]}{K_i}}} \tag{4.24}$$

Aceasta este o ecuație asemanatoare ecuației Michaelis- Menten, constantele K_m și V_{max} fiind amândouă împărțite la factorul $\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)$.

În cazul inhibiției necompetitive expresiile pentru V'_{max} și K'_m sunt date prin relațiile:

$$V'_{max} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I_0]}{K_i}} \qquad \text{și} \qquad K'_m = \frac{K_m}{1 + \frac{[I_0]}{K_i}} \tag{4.25}$$

unde V'_{max} reprezintă valoarea V_{max} în prezența unei concentrații inițiale de inhibitor necompetitiv $[I_0]$, iar K'_m este valoare aparentă a lui K_m în aceleași condiții. O concentrație de inhibitor egală cu K_i va înjumătăți valorile de K_m și V_{max}.

Ecuația Lineweaver-Burk în prezența unui inhibitor necompetitiv devine:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K'_m}{V'_{max}} \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V'_{max}} \tag{4.26}$$

iar panta graficului Lineweaver-Burk este egală cu:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

$$\frac{K_m'}{V_{max}'} = \frac{K_m(1+\frac{[I_0]}{K_i})}{V_{max}(1+\frac{[I_0]}{K_i})} = \frac{K_m}{V_{max}} \qquad (4.27)$$

Cu alte cuvinte, panta graficului Lineweaver-Burk nu se modifică în prezența inhibitorului necompetitiv, dar ambele intersecții cu axele se modifică (figura 4.8).

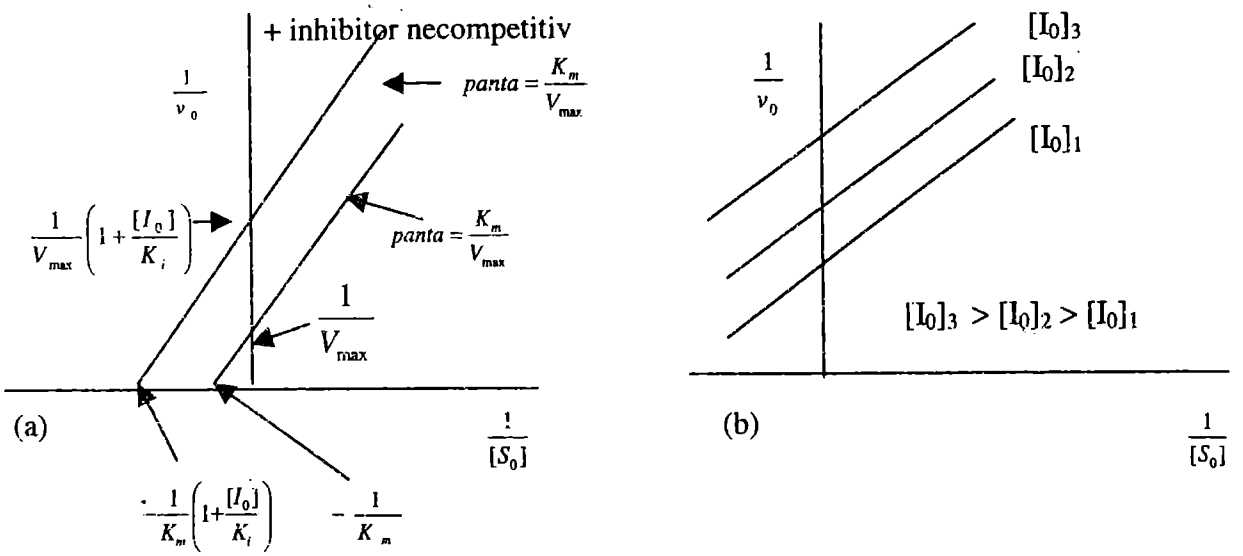


Fig. 4.8 (a) Graficele Lineweaver-Burk pentru inhibiția necompetitivă; (b) aceleași grafice redând influența diferitelor concentrații de inhibitor la o concentrație fixă de enzimă.

Constanta de inhibiție K_i poate fi determinată din graficele **secundare.** În cazul inhibiției necompetitive:

$$\frac{1}{V_{max}'} = \frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{[I_0]}{K_i}\right) \text{ și } \frac{1}{K_m'} = \frac{1}{K_m}\left(1+\frac{[I_0]}{K_i}\right) \qquad (4.28)$$

Deci graficele $1/V_{max}'$ și $1/K_m'$ (obținute respectiv prin intersectarea axelor $1/v_0$ și $1/S_0$ din graficele **primare**) funcție de $[I_0]$ sunt lineare, intersecția cu axele $[I_0]$ dând $-K_i$ (figura 4.9).

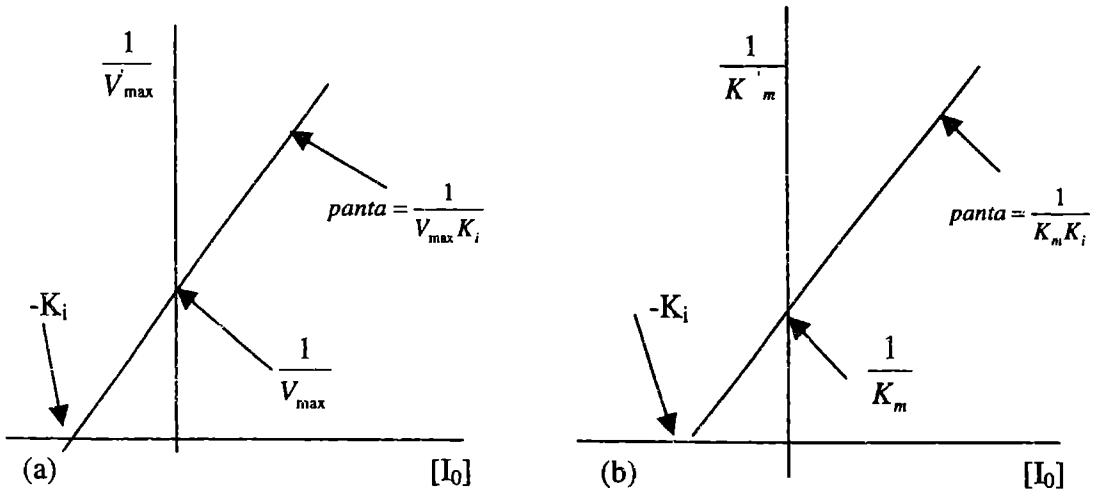


Fig. 4.9 Graficele secundare pentru inhibiția necompetitivă

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Inhibiţia necompetitivă a reacţiilor enzimatice implicând un singur substrat este un proces destul de rar, unul dintre puţinele exemple cunoscute fiind şi inhibiţia arilsulfatazei de către hidrazină.

4.1.1.3 *Inhibiţia non-competitivă*

Inhibitori non-competitivi se leagă de moleculele de enzime, indiferent dacă moleculele de substrat se leagă sau nu, fără a modifica afinitatea enzimei faţă de acesta din urmă proces datorită căruia rezultă un complex inactiv. Din această cauză inhibitorul se leagă de un centru diferit de cel al substratului. Inhibiţia este în acest caz independentă de concentraţia de substrat. Mecanismele principale ale inhibiţiei non-competitive sunt redate în figura 4.10.

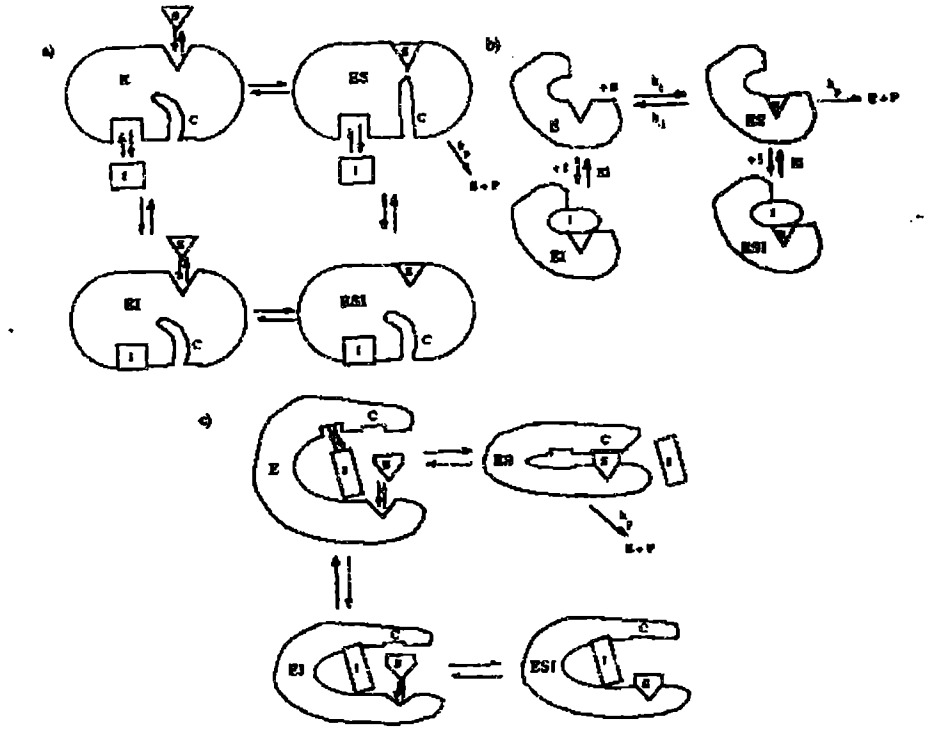


Fig. 4.10 Modele pentru inhibiţia non-competitivă. a) legarea lui I nu împiedică legarea lui S dar conduce la modificări conformaţionale ale centrului catalitic (C); b)legarea lui I împiedică steric legarea lui S; c) dacă I se leagă primul centrul catalitic nu se aliniază faţă de substrat, iar pe de altă parte dacă S se leagă primul el împiedică steric legarea lui S [3].

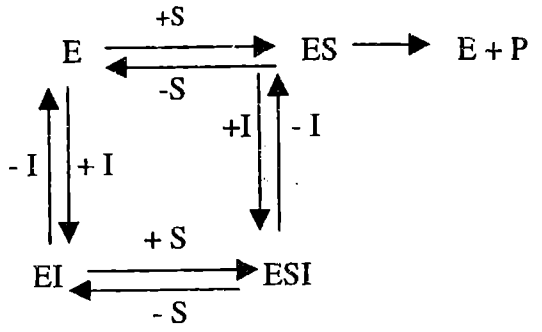
Aceşti compuşi interacţionează cu enzima într-o altă poziţie decât cea corespunzătoare centrului activ astfel încât, deşi formarea complexului ES nu este afectată, este influenţată în schimb, disocierea acestuia şi deci scade viteza de formare a produşilor de reacţie. Acest tip de inhibiţie nu este reversibilă şi deci prin adăugarea unui exces de substrat nu se înlătură efectul ei, iar în general inhibitorii de acest tip nu prezintă o structură similară cu a substratelor.

Există numeroase exemple de inhibitori non-competitivi, mulţi dintre ei fiind toxici pentru diferitele organisme. De exemplu ionii de cianură inhibă orice enzimă care conţine ioni de cupru drept cofactor sau ca parte componentă a centrului activ, cum este cazul citocrom c oxidazei.

Se va considera doar cazul în care inhibitorul distruge activitatea catalitică a enzimei, fie prin legarea la centrul catalitic sau ca un rezultat al modificării conformaţionale afectând astfel centrul catalitic al acesteia, dar fără afectarea legării substratului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Reacţiile de echilibru care descriu inhibiţia non-competitivă redau faptul că I se leagă atât de E cât şi de ES procese în urma cărora rezultă complexele inactive EI şi ESI:



(4.29)

Trebuie notat faptul că şi în condiţii de concentraţie de substrat mare nu toată enzima se află sub forma complexului enzimă substrat. În consecinţă, un inhibitor non-competitiv conduce la scăderea valorii aparente a vitezei maxime în timp ce valoarea aparentă a constantei K_m rămâne nemodificată.

Plecând de la teoria stării staţionare, în această situaţie complexă este imposibil să se obţină o ecuaţie asemănătoare ecuaţitei Michaelis-Menten chiar în condiţiile în care concentraţia de ES poate fi dedusă pe căi alternative. Totuşi, plecând de la ipoteza echilibrului, se pot deduce ecuţii de tip Michaelis-Menten şi grafice Lineweaver-Burk lineare pentru diferite tipuri de inhibiţie non-competitivă. În cel mai simplu model posibil, cel al inhibiţiei non-competitive liniară simplă, substratul nu afectează legarea inhibitorului. În aceste condiţii reacţiile: $E + I \rightleftharpoons EI$ şi $ES + I \rightleftharpoons ESI$ au o constantă de disociere K_i identică, denumită deasemenea constanta de inhibiţie. Concentraţia totală de enzimă este redusă efectiv de către inhibitor, ceea ce duce la o scădere a valoarii V_{max}, dar nemodificând valoarea K_m, întrucât nici inhibitorul nici substratul nu afectează legarea celuilalt.

În cele ce urmează se va deduce ecuaţia vitezei iniţiale, ţinându-se cont de această dată de cazul special pentru care $K_m \approx K_s$. Ca şi în cazurile anterioare valoarea constantei K_m este:

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

În prezenţa inhibitorului non-competitiv, care se legă în mod egal atât de enzimă cât şi de complexul ES, constanta de inhibiţie K_i este dată prin relaţia:

$$K_i = \frac{[E]\cdot[I]}{[EI]} = \frac{[ES]\cdot[I]}{[ESI]} \qquad (4.29)$$

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

$$= [E] + [ES] + \frac{[E]\cdot[I]}{K_i} + \frac{[ES]\cdot[I]}{K_i}$$

$$= ([E] + [ES]) \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \qquad (4.30)$$

de unde:

$$[E] + [ES] = \frac{[E_0]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \qquad (4.31)$$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

şi deci se poate exprima [E]:

$$[E]=\frac{[E_0]}{\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)}-[ES] \tag{4.32}$$

Urmând un raţionament similar cu cel anterior, rezultă că viteza iniţială de reacţie este dată prin relaţia:

$$v_o=\frac{V_{max}}{\left(1+\frac{[I_0]}{K_i}\right)}\frac{[S_0]}{([S_0]+K_m)} \tag{4.33}$$

Ecuaţia (4.33) este asemănătoare ecuaţiei Michaelis-Menten, în care termenul V_{max} este împărţit la factorul $(1+\frac{[I_0]}{K_i})$. Astfel, pentru inhibiţia non-competitivă lineară simplă, K_m este neschimbat, iar V_{max} este modificat astfel încât :

$$V'_{max}=\frac{V_{max}}{1+\frac{[I_0]}{K_i}} \qquad \text{sau} \qquad \frac{1}{V'_{max}}=\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{[I_0]}{K_i}\right) \tag{4.34}$$

unde V'_{max} este valoarea lui V_{max} în prezenţa concentraţiei de inhibitor non-competitiv, $[I_0]$.Se observă că, constanta de inhibiţie K_i reprezintă acea valoare a concentraţiei de inhibitor pentru care se obţine jumătate din viteza maximă V_{max}.

Ecuaţia Lineweaver-Burk pentru inhibiţia noncompetitivă lineară simplă este :

$$\frac{1}{v_0}=\frac{K_m}{V'_{max}}\frac{1}{[S_0]}+\frac{1}{V'_{max}} \tag{4.35}$$

efectul inhibitorilor de acest tip fiind redat în graficele Lineweaver-Burk (figura 4.11).

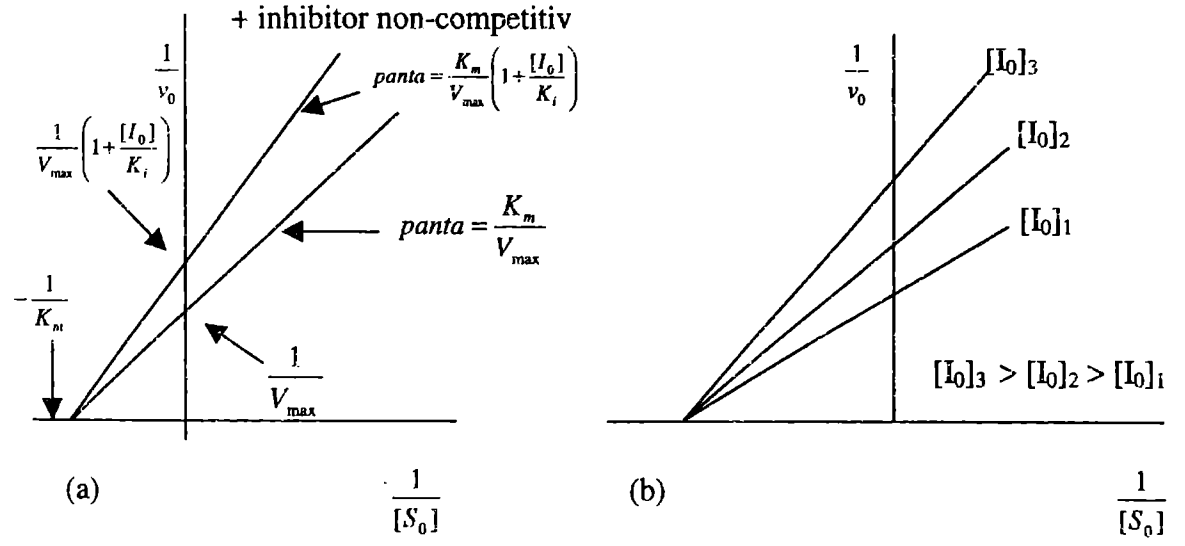


Fig.4.11 a) Graficul Lineweaver-Burk pentru inhibiţia non-competitivă lineară simplă;
b) acelaşi grafic pentru diferite concentraţii de inhibitor la o concentraţie fixă de enzimă.

Odată stabilit tipul de inhibiţie, constanta de inhibiţie K_i poate fi determinată folosindu-se graficele **secundare**. Deoarece:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

$$\frac{1}{V'_{max}} = \frac{1}{V_{max}}(1+\frac{[I_0]}{K_i}) \quad (4.36)$$

panta graficului **primar** Lineweaver-Burk este:

$$\frac{K_m}{V_{max}}(1+\frac{[I_0]}{K_i}) \quad (4.37)$$

rezultă că graficele $\frac{1}{V'_{max}}$ în funcție de $[I_0]$ și panta graficului **primar** funcție de $[I_0]$ sunt lineare, intersecția cu axa $[I_0]$ dând valoarea lui K_i (figura 4.12 a și b).

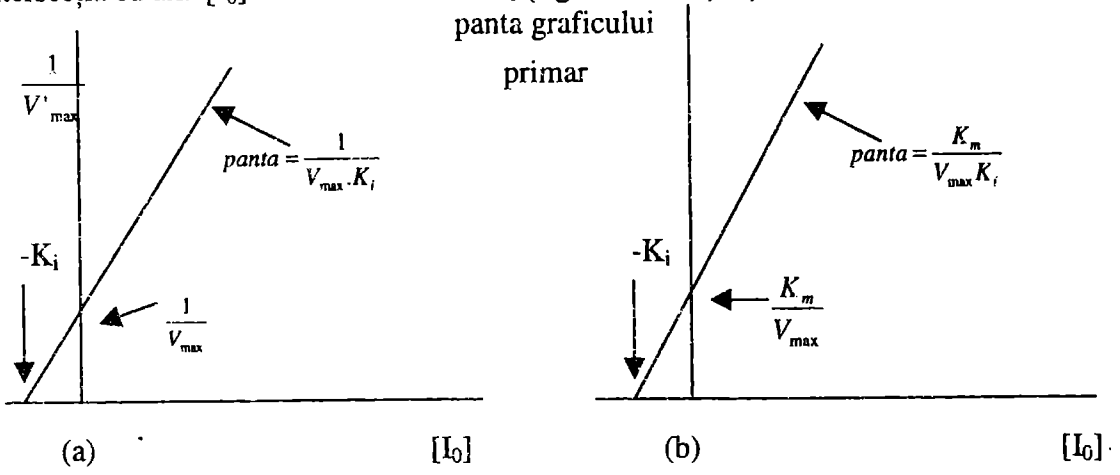


Fig. 4.12 Graficele secundare pentru inhibiția non-competitivă lineară simplă, pentru o concentrație constantă de enzimă $[E_0]$.

În situațiile în care se obține un grafic Lineweaver-Burk linear dar tipul inhibiție observate nu se încadrează în nici unul din cele prezentate anterior (inhibiție competitivă simplă, necompetitivă sau non-competitivă lineară simplă) atunci procesul poate fi încadrat în tipul de inhibiție mixtă, indiferent de mecanismul implicat.

Și în acest caz se cunosc puțini inhibitori de acest tip. Ionii de hidrogen pot reprezenta un exemplu simplu în acest sens; de exemplu chimotripsina a cărei centru activ este acceptor de protoni poate fi inhibată prin creșterea concentrației ionilor de hidrogen, fapt demonstrat de alura graficelor Lineweaver-Burk pentru diferite valori de pH. Trebuie ținut cont totuși de faptul că modificarea pH-ului unei soluții conținând enzima are efecte complexe asupra enzimelor în general. Ionii metalici și compușii organici care se leagă de grupările tiolice ale cisteinei sunt exemple ale inhibiției non-competitive, așa cum sunt și ionii de cianură care se leagă de ionii metalici aparținând enzimelor. Inhibiția acetilcolinesterazei și a L-glicerofosfatazei de către ionii de mercur (Hg^{2+}) reprezintă două exemple de inhibiție non-competitivă de interes pentru controlul poluării mediului. Trebuie înțeles că toxicitatea substanțelor ca cianurile, tiolii și metalele grele este dată de acțiunea lor ca inhibitori enzimatici, indiferent de mecanismul implicat în acest proces.

4.1.1.4 *Inhibiția mixtă*

Acest tip de inhibiție rezultă din cele trei tipuri prezentate mai sus. În toate cazurile de inhibiție mixtă apare o modificare atât a valorii de K_m cât și a celei de V_{max}. Inhibarea fosfatazei alcaline de paraoxon (un insecticid organofosforic) reprezintă un exemplu în acest sens pentru care substratul S prezintă o afinitate mai mare față de complexul EI decât față de E, complexul ESI fiind inactiv.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În paragraful anterior, s-a dedus expresia pentru cazul unei inhibiții non-competitive lineare simple plecându-se de la ipoteza echilibrului și presupunând că legarea substratului și a inhibitorului sunt două procese independente. Se consideră cazul în care cea de a doua ipoteză nu mai este valabilă.

Există două procese prin care inhibitorul se poate fixa la enzimă :

E + I ⟷ EI (caracterizat prin constanta de inhibiție K_i) și

ES + I ⟷ ESI (caracterizat prin constanta de inhibiție K_I)

și deci :

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \text{iar} \quad K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \tag{4.38}$$

Tinându-se cont de faptul că:

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_m \tag{4.39}$$

și că:

$$[E_0] = [E] + [ES] + EI] + [ESI]$$

în care se înlocuiesc valorile constantelor de inhibiție date prin relația (4.38)

$$[E_0] = [E] + [ES] + \frac{[E][I]}{K_i} + \frac{[ES][I]}{K_I} \tag{4.40}$$

rezultă că:

$$[E] = \frac{[E_0] - [ES](1 + \frac{[I]}{K_I}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \tag{4.41}$$

Înlocuind expresia [E] în relația (4.39) se obține:

$$\frac{\left\{[E_0] - [ES](1 + \frac{[I]}{K_I})\right\}[S]}{(1 + \frac{[I]}{K_i})[ES]} = K_m$$

$$[ES]\left\{[S](1 + \frac{[I]}{K_I}) + K_m(1 + \frac{[I]}{K_i})\right\} = [E_0][S] \tag{4.42}$$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{[S](1 + \frac{[I]}{K_I}) + K_m(1 + \frac{[I]}{K_i})}$$

Urmându-se raționamentul menționat în paragrafele anterioare se obține expresia vitezei inițiale:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S_0]}{[S_0](1 + \frac{[I_0]}{K_I}) + K_m(1 + \frac{[I_0]}{K_i})} \tag{4.43}$$

Se împarte atât numărătorul cât și numitorul cu termenul $(1 + \frac{[I_0]}{K_i})$:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

$$v_0 = \frac{\frac{V_{max}}{1+\frac{[I_0]}{K_I}}[S_0]}{[S_0]+\frac{K_m(1+\frac{[I_0]}{K_i})}{(1+\frac{[I_0]}{K_I})}} \qquad (4.44)$$

Această ecuație este o formă asemănătoare ecuației Michaelis-Menten ea putând-se scrie sub forma:

$$v_0 = \frac{V'_{max}[S_0]}{[S_0]+K'_m} \qquad (4.45)$$

unde:

$$V'_{max} = \frac{V_{max}}{(1+\frac{[I_0]}{K_I})} \qquad \text{şi} \qquad K'_m = K_m \frac{(1+\frac{[I_0]}{K_i})}{(1+\frac{[I_0]}{K_I})} \qquad (4.46)$$

În mod similar, ecuația Lineweaver-Burk este dată prin relația :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K'_m}{V'_{max}}\frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V'_{max}} \qquad (4.47)$$

graficul Lineweaver-Burk fiind linear. În general atât K_m, V_{max} cât şi panta corelate prin expresia:

$$\frac{K'_m}{V'_{max}} = \frac{K_m}{V_{max}}(1+\frac{[I_0]}{K_i}) \qquad (4.48)$$

sunt influențate de prezența inhibitorului.

Astfel, graficele la diferite concentrații de inhibitor (şi la concentrație fixă de enzimă $[E_0]$) nu se vor intersecta pe nici o axă, nici nu vor avea aceleaşi pante, şi deci tipul de inhibiție va fi diferit de celelalte tipuri caracteristice competitive, necompetitive şi non-competitive. Acest tip de inhibiție poartă numele de inhibiție mixtă. Când $K_I > K_i$, graficele se intersectează la stânga axei $1/v_0$ şi deasupra axei $1/S_0$ (figura 4.13 a).

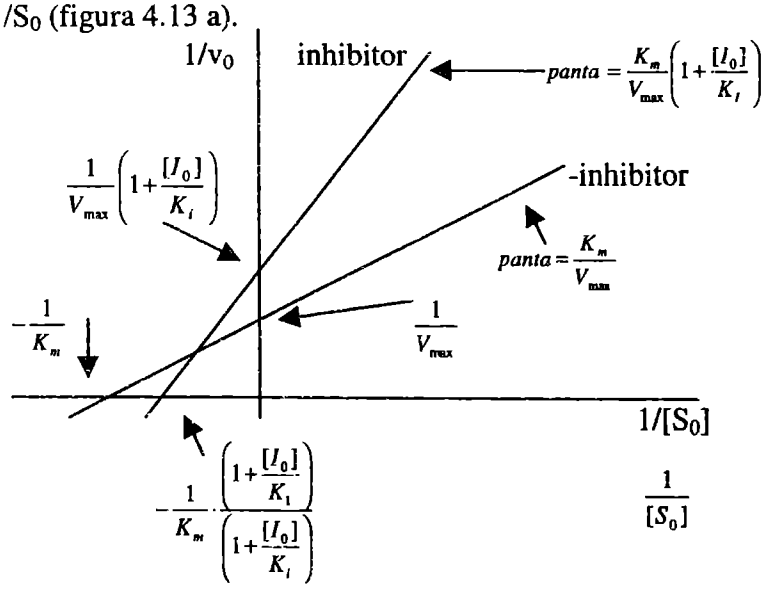


Fig.4.13 a) Graficul Lineweaver-Burk pentru inhibiția mixtă, când $K_I > K_i$.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Această formă de inhibiţie mixtă este denumită inhibiţie competitivă-non-competitivă, deoarece tipul de inhibiţie observat este între cel al inhibiţiei competitive şi non-competitive (figurile 4.5 şi respectiv 4.11).

Când $K_I < K_i$, graficele se intersectează încrucişează la stânga axei $1/v_0$ dar dedesubtul axei $1/S_0$ (figura 4.13 b). Această formă de inhibiţie mixtă se numeşte inhibiţie non-competitivă-necompetitivă, deoarece tipul de inhibiţie este intermediar între acestea (figurile 4.11 şi respectiv 4.8)

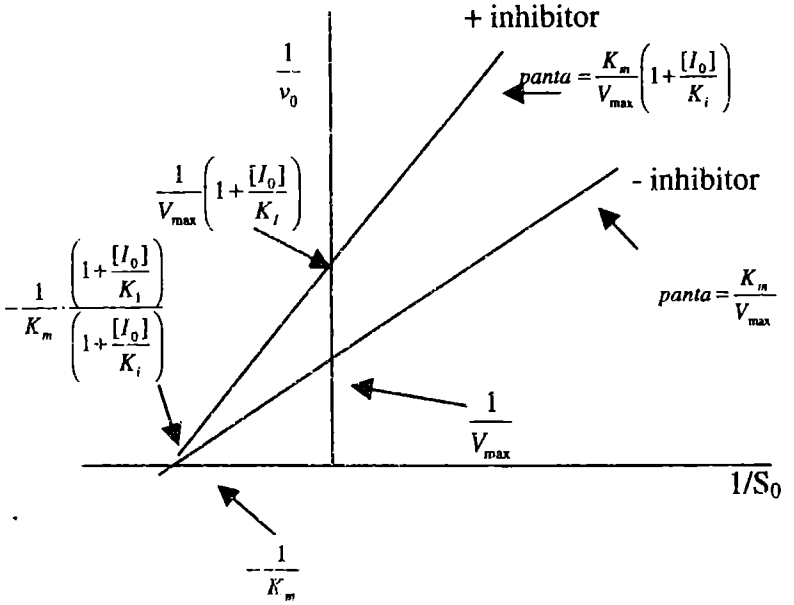


Fig.4.13 b) Graficul Lineweaver-Burk pentru inhibiţia mixtă, când $K_I < K_i$.

În oricare din cele două cazuri K_I si K_i se determină din graficele **secundare**.În cazul inhibiţiei mixte:

$$\frac{1}{V'_{max}} = \frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{[I_0]}{K_i}\right) \qquad (4.49)$$

şi deci:

panta pentru reacţia inhibată = panta reacţiei neinhibate înmulţită cu $\left(1+\frac{[I_0]}{K_i}\right)$.

Deci graficul **secundar** $1/V'_{max}$ funcţie de $[I_0]$ va fi linear, intersecţia cu axa $[I_0]$ dând $-K_I$ (figura 4.14 a), iar reprezentarea pantei graficului **primar** funcţie de $[I_0]$ va fi de asemenea linear, intersecţia cu axa $[I_0]$ dând $-K_I$ (figura 4.14 b).

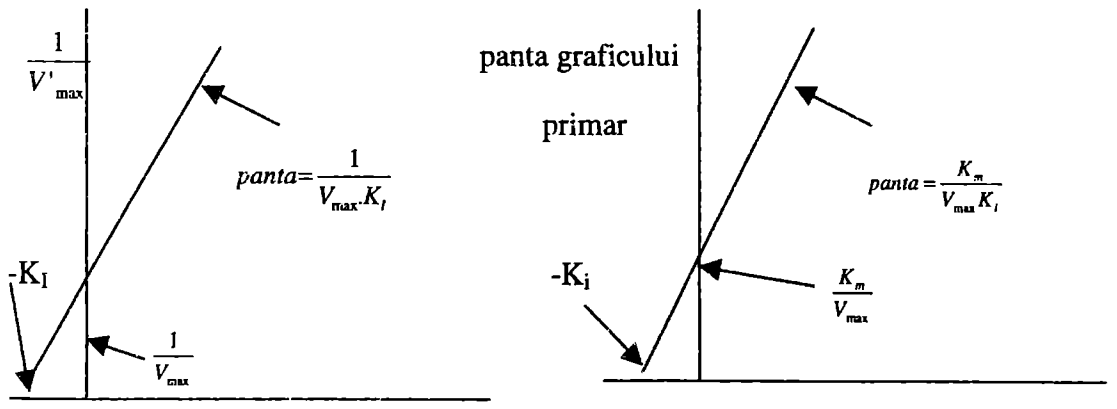


Fig. 4.14 Graficele secundare pentru inhibiţia mixtă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Deoarece $K_m^{'} = K_m \frac{(1+\frac{[I_0]}{K_i})}{(1+\frac{[I_0]}{K_I})}$ rezultă că graficul $K_m^{'}$ funcţie de $[I_0]$ nu va fi linear.

Ecuaţia vitezei iniţiale v_0 dedusă mai sus este relativ generală deoarece nu sau făcut nici un fel de ipoteze relative la valorile K_i şi K_I, ea poate fi simplificată pentru cazuri speciale. Dacă ESI nu se poate forma atunci $K_I = \infty$ şi ecuaţia devine identică cu cea pentru inhibiţia competitivă, indiferent dacă substratul şi inhibitorul se leagă la acelaşi centru sau la centre de legare diferite.

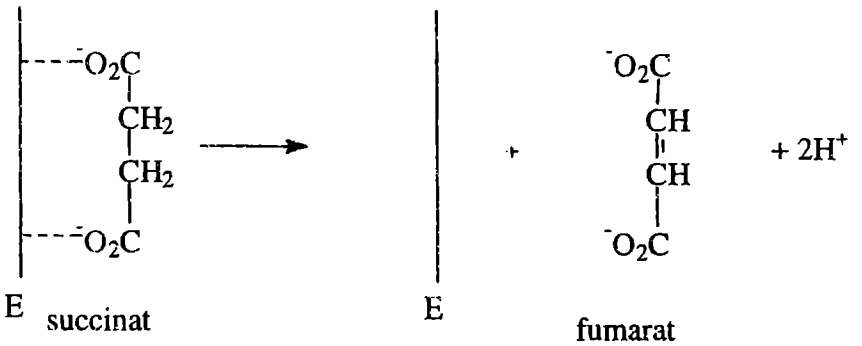
Dacă complexul ESI se poate forma, dar nu are loc formarea complexului EI, atunci $K_i = \infty$ şi ecuaţia se simplifică la cea corespunzătoare tipului de inhibiţie necompetitive.

Când $K_i = K_I$, ecuaţia se reduce la cea corespunzătoare inhibiţiei non-competitive lineare simple.

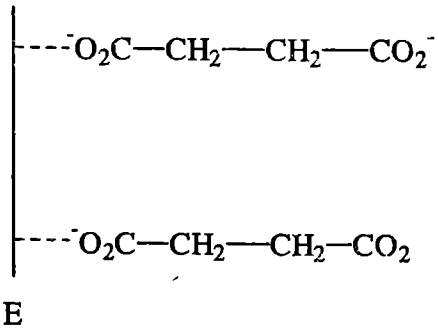
4.1.1.5 *Inhibiţia prin substrat*

Caracteristica reacţiilor catalizate enzimatic, aşa după cum s-a arătat, este aceea că la o concentraţie fixă de enzimă viteza iniţială creşte odată cu creşterea concentraţiei iniţiale de substrat până la o valoare limită V_{max}. La concentraţii mai mari de substrat, viteza iniţială pare a fi mai mică decât viteza maximă . În anumite cazuri astfel de situaţii pot fi explicate prin interacţia dintre sistemul de detecţie si substrat, iar în alte cazuri prin faptul că la concentraţii foarte mari de substrat apare o inhibiţie a transformării acestuia în produşi.

Se consideră în continuare mecanismul posibil de inhibiţie prin substrat la concentraţii mari ale acestuia, pentru o reacţie catalizată de succinat dehidrogenază. Pentru ca reacţia să se desfăşoare trebuie ca ambele grupări carboxil ale substratuluisă se lege de enzimă:



La concentraţii foarte mari de substrat există o probabilitate crescută ca două grupări carboxil aparţinând la două molecule separate de substrat să se lege de aceiaşi moleculă de enzimă:



În acest caz, reacţia nu are loc până când una din cele două molecule nu disociază.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Trăsăturile caracteristice ale inhibiției prin substrat sunt redate în figura 4.15. În general se observă că inhibiția prin substrat apare atunci când o moleculă de substrat se leagă de enzimă și o a doua moleculă de substrat se leagă de un centru separat al enzimei rezultând un complex inactiv. Aceasta poate fi privită ca o formă de inhibiție necompetitivă a doua moleculă de substrat putând fi privită ca un inhibitor.

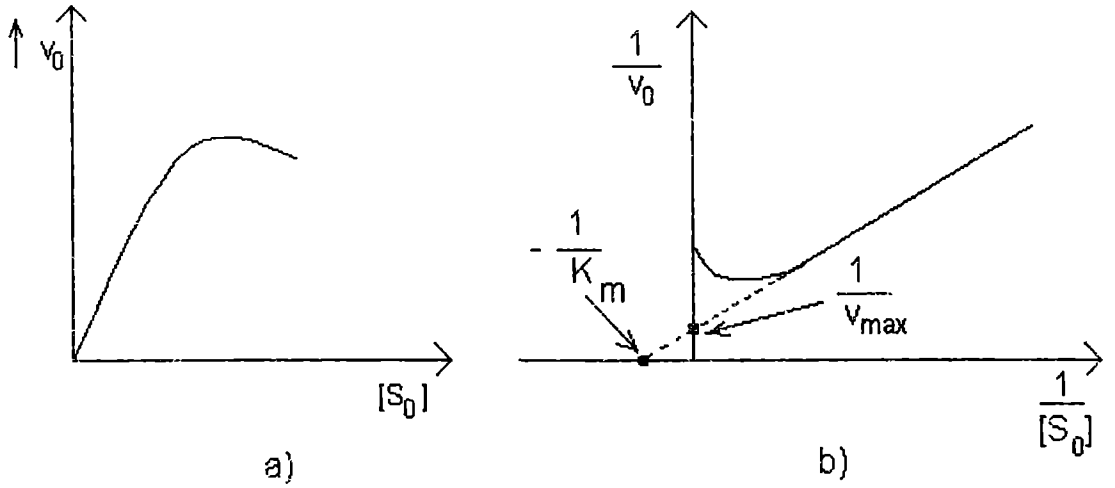


Fig. 4.15 Graficele Michaelis Menten (a) și Lineweaver-Burk (b) care redau inhibiția prin substrat

După cum s-a arătat, ecuația vitezei inițiale în cazul inhibiției necompetitive este dată prin relația:

$$v_0 = \frac{\dfrac{V_{max}}{\left(1+\dfrac{[I_0]}{K_i}\right)}[S_0]}{[S_0]+\dfrac{K_m}{\left(1+\dfrac{[I_0]}{K_i}\right)}} \qquad (4.50)$$

dacă inhibitorul este identic cu substratul, ecuația devine:

$$v_0 = \frac{\dfrac{V_{max}}{\left(1+\dfrac{[I_0]}{K_i}\right)}[S_0]}{[S_0]+\dfrac{K_m}{\left(1+\dfrac{[I_0]}{K_i}\right)}} = \frac{V_{max}[S_0]}{[S_0]\left(1+\dfrac{[S_0]}{K_i}\right)+K_m} \qquad (4.51)$$

Această ecuație este descrisă de curbele din figura 4.15. La concentrații mici de substrat, termenul $[S_0]/K_i$ este neglijabil, expresia reducându-se la o ecuație Michaelis-Menten normală. Când $[S_0]$ este foarte mare, atunci rezultă că:

$$[S_0]\left(1+\frac{[S_0]}{K_i}\right)+K_m \equiv [S_0]\left(1+\frac{[S_0]}{K_i}\right) \qquad (4.52)$$

ecuația simplificându-se la forma:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

$$v_0 = \frac{V_{max}}{1 + \left(\frac{[S_0]}{K_i} \right)} \qquad (4.53)$$

în aceste condiţii v_0 scade pe măsură ce $[S_0]$ creşte, aşa cum s-a observat la inhibiţia prin substrat pentru concentraţii mari de substrat.

4.1.2. INHIBIŢIA IREVERSIBILĂ

Un inhibitor ireversibil se leagă de centrul activ al enzimei printr-o reacţie ireversibilă:

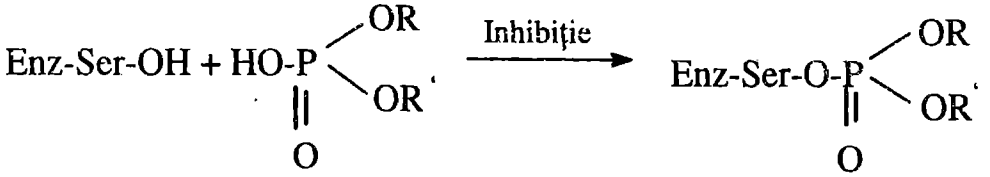
$$E + I \longrightarrow E\text{-}I$$

şi deci ulterior nu poate disocia; în general inhibitorii de acest tip spre deosebire de cei reversibili conduc la formarea unei legături covalente între inhibitor şi enzimă. Inhibitorul poate acţiona asupra enzimei prin împiedicarea legării substratului de aceasta sau poate distruge anumiţi componenţi aparţinând centrului catalitic. În practică nici un proces nu este total ireversibil dar, un inhibitor care prezintă o afinitate mare faţă de enzimă (constanta de disociere aproximativ 10^{-9} mol/l), este privit ca fiind nereversibil. Spre deosebire de inhibiţie reversibilă unde echilibrul dintre inhibitor şi enzimă este atins rapid, sistemul putând fi urmărit prin studii asupra vitezei iniţiale, inhibiţia ireversibilă este progresivă şi crescătoare în timp, până când tot inhibitorul sau toată enzima prezentă a fost transformat în complexul enzimă –inhibitor.

Studiile asupra vitezei iniţiale nu conduc de loc sau, conduc la foarte puţine informaţii relative la caracteristicile inhibitorului, indiferent dacă reacţia dintre enzimă şi inhibitorul ireversibil decurge total. Este mult mai util ca sistemul să fie descris în termenii constantei de viteză de legare a inhibitorului de substrat. Dacă aceştia reacţionează în proporţie de 1:1, atunci timpul necesar pentru a reduce activitatea enzimei cu 50% din valoarea iniţială va fi invers proporţional cu concentraţia de inhibitor (la o concentraţie fixă de enzimă).

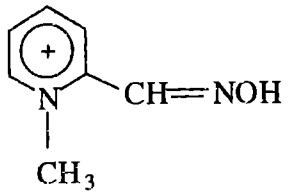
Dacă inhibitorul se află în exces, toate moleculele de enzimă se leagă de inhibitor, activitatea enzimatică scăzând practic spre zero. În general, legarea unui astfel inhibitor de centrul catalitic va distruge total activitatea enzimei, dar în condiţiile legării lui de substrat poate exista probabilitatea mică a unei catalize enzimatice, în ipoteza că centrul catalitic rămâne activ şi accesibil moleculelor de substrat din soluţie.

Deci, datorită naturii ireversibile a inhibiţiei, reacţia nu poate fi discutată în termenii unei situaţii de echilibru ci în termenii vitezei iniţiale. Parametrul important este constanta de viteză bimoleculară k_i (tabelul 4.2). Ecuaţia Aldridge este valabilă atunci când concentraţia de inhibitor este mult mai mare decît cea a centrelor active ale enzimei. Odată cu legarea inhibitorului de enzimă, complexul tranzitoriu EI evoluează rapid spre un nou complex EI' ireversibil rezultat ca urmare a modificărilor structurale. De exemplu, legarea insecticidelor organofosforice de colinesterază duce la fosforilarea restului de serină din centrul catalitic al enzimei:

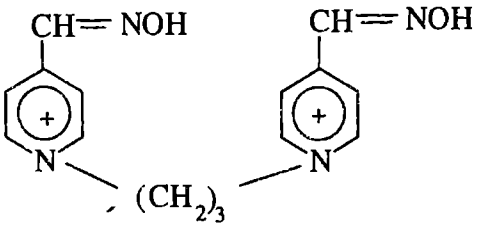


Activitatea enzimei nu poate fi regenerată prin scăderea concentraţei de inhibitor, astfel înât enzima trebuie regenerată şi reactivată utilizând reactivi speciali. Colinesterazele fosforilate pot fi reactivate prin folosirea unui compus puternic nucleofil cum este 2-PAM ((metiodura de 2-piridinaldoximă) sau TMB-4 ({1,1'-trimetilenbis-4-(hidroxiimino-metil) bromura de piridiniu}):

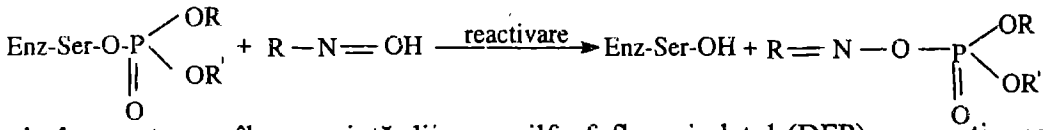
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



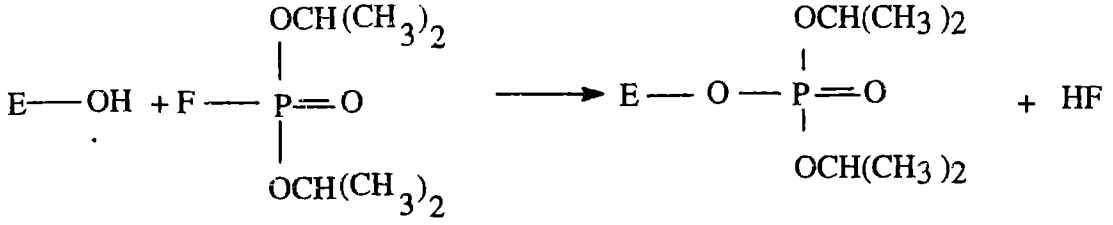
2-PAM



TMB- 4



Un exemplu în acest sens îl reprezintă diizopropilfosfofluoroiodatul (DFP) care acționează asupra sistemului nervos prin inactivarea acetilcolinesterazei:



enzima DFP

Inhibitorii ireversibili reduc în mod efectiv concentrația enzimei prezente. Un inhibitor de concentrație inițială $[I_0]$ va reduce concentrația de enzimă activă de la valoarea [E] la [E] - [I], presupunând că acesta ne se găsește în exces. Dacă, după un timp oarecare în care reacția dintre inhibitor și enzimă a decurs total, în amestecul de reacție se introduce substratul, se obține o ecuație de tipul Michaelis-Menten. Valoarea de K_m va fi identică cu cea obținută pentru cazul unei reacții neinhibate, dar V_{max} se va reduce la o valoare notată cu V'_{max}.

În absența inhibitorului $$V_{max} = k_{cat}[E_0] \tag{4.54}$$

În prezența inhibitorului $$V'_{max} = k_{cat}([E_0]-[I_0]) \tag{4.55}$$

$$\frac{V'_{max}}{V_{max}} = \frac{[E_0]-[I_0]}{[E_0]} \tag{4.56}$$

$$V'_{max} = V_{max}[E_0]\left(1-\frac{[I_0]}{[E_0]}\right) \tag{4.57}$$

Rezultate similare se pot obține chiar dacă reacția dintre inhibitor și enzimă nu de curge total, în ipoteza că gradul de inhibiție a fost constant pe perioadaefectuării studiilor asupra vitezei inițiale. Deci, în cazul inhibitorilor ireversibili pot apărea forme de inhibiție asemănătoare cu cele ale inhibiției non-competitive și care prezintă valori nemodificate de K_m și valori reduse ale V_{max}, chiar în condițiile în care inhibitorul se leagă la același centru ca și substratul. Cu toate acestea, există o diferențiere clară între cele două tipuri de inhibiție și orice încercare de calcul a K_i din măsurători ale vitezei inițiale este sortită eșecului, deoarece în acest caz realția dintre V'_{max} și V_{max} nu implică

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

şi K_m. În concluzie, dacă în urma studierii unui sistem rezultă un tip de inhibiţie non-competitivă, trebuie stabilit dacă aceasta acesta corespunde unei inhibiţii reversibile sau ireversibile.

Ionii metalici (tabelul 4.1) pot fi consideraţi drept inhibitori ireversibili datorită vitezei foarte mici a reversibilităţii inhibiţiei. Aceşti compuşi acţionează prin legarea metalului de grupele tiol ale proteinelor. În consecinţă, ţinta principală a acţiunii metalelor grele o reprezintă enzimele din clasa dehidrogenazelor şi oxidazelor care prezintă resturi de cisteină în jurul centruluu activ:

$$E\text{-}SH + M^+ \leftrightarrow E\text{-}SM + H^+$$

În unele cazuri, enzimele care au fost inhibate cu metale grele pot fi reactivate prin folosirea unor agenţi de complexare cum EDTA sau tiolii (ditiotreitol).

Mulţi inhibitori ireversibili atacă grupele –SH ale catenei laterale aparţinând cisteinei, care sunt prezente în centrul activ al enzimelor. Exemple în acest sens sunt date de o serie de agenţi cum sunt acetatul de iod şi iodacetamida, care formează legături covalente cu grupele –SH:

$$E-SH + ICH_2 \cdot CO_2^- \longrightarrow E-S-CH_2 \cdot CO_2^- + HI$$

enzima acetat de iod

O altă diferenţă comparativ cu inhibiţia reversibilă este necesitatea realizării unei incubări prealabile între enzimă şi inhibitor fapt datorat vitezei mici a procesului de inhibiţie. Din acest motiv gradul inhibiţiei şi sensibilitatea sistemului sunt direct corelate cu timpul de incubare.

Inhibitorii ireversibili prezintă importanţă şi în studiul centrului activ al enzimelor, datorită faptului că, spre deosebire de substrat, aceştia rămân ferm legaţi de unul dintre resturile de aminocizi prezenţi în structura enzimei acţionând astfel ca markeri pentru identificarea acestuia.

4.2. INHIBIŢIA ENZIMELOR IMOBILIZATE PE SUPRAFAŢA BIOSENSORILOR

Folosirea enzimelor imobilizate în locul celor solubile ridică o serie de noi probleme în detectarea inhibitorilor. În primul rînd, imobilizarea unei enzime în general conduce la modificări conformaţionale ce-i pot afecta activitatea şi sensibilitatea la inhibiţie. De exemplu, s-a arătat faptul că inhibiţia în soluţie a L-glicerofosfat oxidazei de către sărurile mercur a fost reversibilă şi non-competitivă şi ireversibilă în urma imobilizării ei într-un film de gelatină. În plus, o serie de lucrări au demonstrat că imobilizarea conduce la o scăderea activitaţii enzimelor faţă de inhibitori.

Aspectele teoretice ale folosirii electrozilor enzimatici bazaţi pe reacţii de inhibiţie au fost analizate de către mulţi cercetători. Prin utilizarea biosenzorilor, procesul inhibiţiei este influenţat de o serie de parametrii noi şi diverşi cum ar fi efectele micromediului, limitările datorate difuziei şi posibilele interacţii intre substrat şi/sau inhibitor cu membrana. Acest efect de adsorbţie poate fi micşorat prin adiţia de surfactanţi, mărindu-se astfel sensibilitatea biosenzorului faţă de pesticidele organofosforice.

Spre deosebire de biosenzorii folosiţi la determinarea substratelor, detecţia inhibitorilor necesită folosirea unei cantităţi mici de enzimă pentru determinarea unor concentraţii foarte mici de inhibitori. În consecinţă, electrozii enzimatici folosiţi în aceste determinări analize trebuie să funcţioneze sub un control cinetic. Acest concept nu este uzual în proiectarea biosenzorilor pentru determinări de substrate, unde se folosesc concentraţii mari de enzime, răspunsul fiind controlat de difuzie.

În general detecţia inhibitorilor decurge în trei etape (figura 4.16 a):

1. Prima etapă este determinarea răspunsului iniţial (I_1) al biosenzorului faţă de o concentraţie suficient de mare a substratului;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2. A doua etapă constă în incubarea biosenzorului cu inhibitorul pentru o perioadă definită de timp;
3. Ultima etapă este reprezentată de determinarea răspunsului rezidual (I_2) al biosenzorului folosindu-se o aceeaşi concentraţie de substrat ca şi în prima etapă. Gradul de inhibiţie (I %) este apoi calculat prin compararea răspunsurilor înainte si după inhibiţie, conform relaţiei (4.58):

$$I = \frac{(I_1 - I_2)}{I_1} \times 100 \qquad (4.58)$$

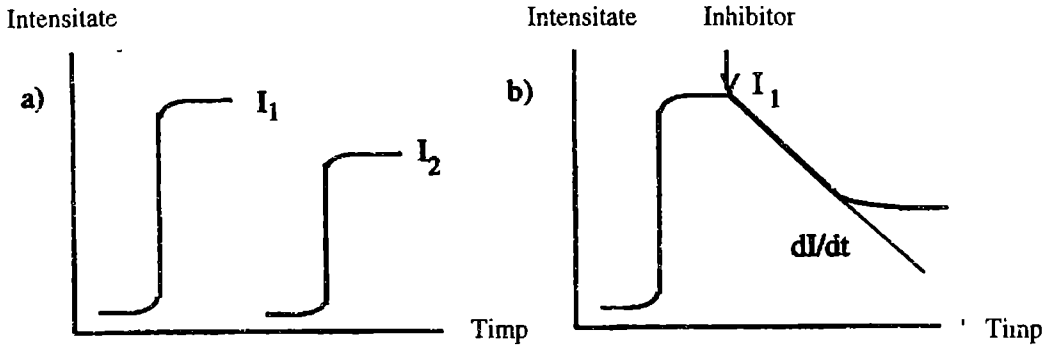


Fig.4.16 Reprezentarea schematică a două posibile metode determinare a inhibitorilor bazate pe biosensori. a) determinarea indirectă: răspunsul faţă de substrat este măsurat înainte (I_1) şi după (I_2) în urma incubării cu inhibitorul pe o perioadă definită de timp; b) determinarea directă: inhibitorul este adăugat în amestecul de reacţie imediat după atingerea răspunsului stării staţionare (I_1) faţă de substrat.

Principalul inconvenient al procedeului este acela că durează mult în timp deoarece presupune două măsurători separate a activităţii, precum şi o etapă adiţională de incubare cu inhibitorul. Totuşi, prin această metodă pot fi determinate concentraţii foarte mici de inhibitori.

O alternativă a procedeului descris constă în adăugarea într-o primă etapă a unei concentraţii corespunzatoare de substrat în mediul de reacţie. Când se atinge curentul stării staţionare, în mediul de reacţie se injectează o anumită concentraţie de inhibitor (figura 4.16 b), ceeace va condce la o scădere a intensităţii curentului în timp(dI/dt). Inhibiţia relativa (RI) se determină prin relaţia (4.59):

$$RI = \frac{\left(\frac{dI}{dt}\right)}{I_1} \qquad (4.59)$$

Cu toate că metoda este rapidă ea prezintă dezavantajul unei sensibilităţi mici faţă de inhibitori. Acest neajuns se poate datora faptului că timpul de contact dintre enzimă şi inhibitor este prea mic pentru a putea determina o inhibiţie notabilă în prezenţa unor concentraţii foarte mici de inhibitor.

4.3. APLICAŢII BIOANALITICE ALE REACŢIILOR DE INHIBIŢIE

Multe enzime sunt inhibate de o serie de substanţe care au importanţă din punct de vedere al mediului, cum sunt pesticidele sau metalele grele (tabelul 4.1). Detecţia acestor compuşi în concentraţii foarte mici necesită existenţa unor tehnici analitice foarte sensibile şi precise. De exemplu directiva Comunităţii Europeene relativă la calitatea apei potabile stabileşte pentru pesticide o concentraţie maximă admisibilă de 0,1 ppb pentru pesticidele individuale şi a produşilor înrudiţi şi de 0,5 ppb pentru pesticidele totale. Există un număr foarte mare de metode de identificare şi determinare a acestor compuşi dintre care se amintesc spectrometria în U.V. şi I.R,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cromatografia de lichide de înaltă performanţă (HPLC) şi de gaze (GC), spectrometria de masă (MS) precum şi metode tandem (GC/MS, HPLC/MS). Unele dintre acestea sunt foarte sensibile iar prin intermediul unora pot fi deosebiţi compuşi aparţinând aceleiaşi clase. In ciuda sensibilităţii lor aceste metode au la bază o aparatură scumpă, sunt laborioase, necesită un personal calificat şi nu pot fi utilizate *in situ* pentru determinări continue.

În ultimii ani, o atenţie deosebită s-a acordat realizării de biosensori care permit o determinare continuă şi rapidă a diferiţilor compuşi. Astfel de instrumente au la bază enzime imobilizate şi fixate pe suprafaţa unor traductori fizici. In acest sens au fost realizaţi o serie de electrozi enzimatici bazaţi pe reacţii de inhibiţie pentru determinarea unor poluanţi ai mediului. Enzima cea mai des utilizată în construcţia unor astfel de biosensori este colinesteraza care a fost folosită pentru determinarea insecticidelor organofosforice (care sunt inhibitori ireversibili fiind necesară reactivarea enzimei în urma inhibiţiei).

O altă clasă de compuşi toxici importanţi este reprezentată de sărurile metalelor grele. Ele sunt în general determinate folosindu-se enzime imobilizate din clasa dehidrogenazelor şi oxidazelor. Trebuie menţionat faptul că unele metale grele acţionează şi ca activatori sau cofactori ai enzimelor conducând astfel la o creştere a activităţii acestora în prezenţa poluanţilor. De exemplu anhidraza carbonică se leagă în mod specific de cofactorul ei –ionii de Zn^{2+}- pentru a da naştere holoenzimei active. Bazat pe aceasta, s-a realizat un sensor optic prin intermediul căruia se pot determina concentraţii de ordinul nanomolar de zinc. Spre deosebire de metodele chimice de determinare, metodele enzimatice par a fi mai simple şi mai sensibile. Totuşi aceste instrumente suferă de lipsa unei specificităţi deoarece există mulţi compuşi care conduc la inhibarea activităţii enzimatice. Cu toate acestea, lipsa de specificitate poate conduce la evaluarea unui indice global de toxicitate.

4.3.1 DETERMINAREA PESTICIDELOR ORGANOFOSFORICE ŞI CARBAMATE

Insecticidele organofosforice si carbamate reprezintă un procent mare din pesticidele (insecticide, fungicide şi ierbicide..) folosite in mod frecvent. Aceste pesticide au efecte dăunătoare întrucât acţionează ca inhibitori ai colinesterazei care este implicată în transmisia neuronală. Nu este deci surprinzător că în literatura de specialitate cel mai frecvent sunt descrişi electrozii bazaţi pe colinesteraze ca principaliii electrozi folosiţi pentru detecţia pesticidelor. Acetil- sau butiril-colinesteraza (AchE, EC 3.1.1.7 sau BuChE, EC 3.1.1.8), enzime ce catalizează hidroliza acetil- sau butiril-colinei la colină si acetat sau butirat, au fost purificate şi sunt acum disponibile sub formă comercială. După cum s-a menţionat folosirea colinesterazei în construcţia biosensorilor nu permite o determinare selectivă a unei pesticide anume, ea prermiţând însă o estimare a activităţii totale anticolinesterazice a probei. Această activitate reprezintă "indexul toxicologic " care este definit drept cantitatea de compuşi care induc un procent de inhibiţie colinesterazică echivalent cu cel produs de o cantitate cunoscută a unei pesticide de referinţă. Drept compus de referinţă, de cele mai multe ori, se utilizeaează paraoxonul, deoarece acest compus este stabil, disponibil sub formă comercială şi cunoscut ca având o activitate puternic inhibitorie asupra colinesterazelor. Fiecare colinesterază a fost caracterizată prin afinitatea proprie faţă de insecticidele organofosforice şi carbamate. Activitatea şi stabilitatea colinesterazelor, precum şi sensibilitatea lor faţă de un anumit inhibitor depind de tipul si sursa colinesterazei. Astfel, selectarea unei colinesteraze adecvate este un pas important în proiectarea unui biosenzor pentru pesticide. În continuare, se vor discuta în special aplicaţiile biosenzorilor potenţiometrici şi amperomentrici bazaţi pe reacţii de inhibiţie a enzimelor în detecţia unor poluanţi.

În general biosenzorii potenţiometrici se bazează pe măsurarea modificărilor de pH, sau de potenţial. De exemplu, modificarea pH-ului poate rezulta ca urmare a formării unui acid organic în cadrul unei reacţii de hidroliză a esterului colinei, reacţie catalizată de o esterază specifică, şi care poate fi urmărită cu ajutorul unui electrod de pH:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

$$\text{acetil- (sau butiril-)colina} + H_2O \xrightarrow{\text{ChE}} \text{colina} + \text{acetat (sau butirat)}$$

Aşa cum se observă din tabelul 4.3, cea mai mare sensibilitate (0,3 ppb) a fost obţinută prin folosirea AchE imobilizată în gel de poliacrilamidă prin legare încrucişată şi fixată pe suprafaţa unui electrod de sticlă. În general, cu excepţia de mai sus, limitele de detecţie raportate au fost în general în jur de 3 ppb (tabelul 4.3).

Tab. 4.3 Electrozi potenţiometrici bazaţi pe colinesteraze [11]

Enzima	**Mod de imobilizare**	**Limita de Detecţie a paraoxonului (ppb)**
BuChE (ns)	Legare încrucişată cu BSA şi glutaraldehidă	3
BuChE (hs)	Imobilizare pe naylon cu HAS şi glutaraldehidă	3
AchE (ns)	Legare încrucişată în Poliacrilamidă	0,3
AchE	Imobilizare pe membrană de nitrat de celuloză biotinilată folosind şi legarea încrucişată baztă pe streptavidină	2,8

AChE: acetilcholinesteraza; BSA: albumina serică bovină; BuChE: butirilcolinesterază; hs : ser de cal; HSA: albumină serică umană; ns : nespecificat.

Metodele potenţiometrice sunt rapide si precise, dar ele au limite de detecţie relativ mari.

Metoda amperometrică de detecţie este în general mult mai sensibilă, permiţând totodată obţinerea unui semnal analitic direct proporţional cu concentraţia analitului. În funcţie de substratul colinesterazic implicat în reacţie, au fost descrise diferite metode amperometrice implicând sisteme mono- sau bi-enzimatice, bazate pe detecţia tiocolinei, O_2, H_2O_2, sau 4-aminofenol. Astfel, au fost realizaţi electrozi bienzimatici implicând reacţii cuplte între colinesterază şi colin oxidaza (ChOD) , avînd drept substrate acetil- sau butiril-colina, măsurătorile fiind bazate pe detecţia oxigenului sau a apei oxigenate (ultima fiind mai sensibilă, tabelul 4.4):

$$\text{acetil- (sau butiril-)colina} + H_2O \xrightarrow{\text{ChE}} \text{colina} + \text{acetat (sau butirat)}$$

$$\text{colina} + 2\,O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{ChOD}} \text{betaina} + 2\,H_2O_2$$

Este posibilă efectuarea unei reacţii de hidroliză preliminară a substratului folosind colinesteraza în soluţie urmată de detecţia colinei prin intermediul biosenzorului pentru colină, obţinându-se în acest fel o limită de detecţie de 0,5 ppb paraoxon. Folosindu-se un biosensor pentru colină în care AchE a fost imobilizată separat de ChOD, fapt care permite efectuarea incubării şi a realizarea măsurătorilor în mod independent, obţinându-se o limită de detecţie de 1,3 ppb paraoxon.

Un alt mod de proiectare constă în co-imobilizarea celor două enzime pe suprafata electrodului, ceea ce a condus la obţinerea unor sensibilitati mai mari si a unor timpi de răspuns mai mici.

Proiectarea senzorului si optimizarea performanţelor acestuia pot fi simplificate prin folosirea unor sisteme mono-enzimatice bazate pe hidroliza acetil- sau butiril tiocolinei de către o

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

colinesterază selectată (AchE sau BuChE). Folosind acest principiu, detecţia se bazează pe oxidarea tiocolinei produse la suprafaţa unui electrod de platină (tabelul 4.5):

$$\text{acetil- (sau butiril-) tiocolina} + H_2O \xrightarrow{\text{ChE}} \text{tiocolina} + \text{acetat (sau butirat)}$$

$$2\ \text{tiocholina} \xrightarrow{\text{410 mV vs. Ag/AgCl (Pt)}} \text{ditio-bis-colina} + 2\ H^+ + 2\ e^-$$

Tab. 4.4 Electrozi bienzimatici bazaţi pe detecţie amperometrică (detecţia 0_2 sau a H_20_2).

Modul de immobilizare al enzimelor	Potenţialul	Limita de detecţie a paraoxonului (ppb)
BuChE (hs) + ChOD Două enzime pe membrană de dializă	Electrod de oxigen tip Clark	300
AChE (ns) + ChOD Legare covalentă pe naylon folosindu-se glutaraldehida	650 mV vs. Ag/AgCl (Pt)	2
(AchE (ns) or BuChE (ns) + ChOD Legare covalentă pe naylon folosindu-se glutaraldehida	650 mV vs. Ag/AgCl (Pt)	2
AchE (ee) + ChOD Imobilizare pe PVA-SbQ	650 mV vs. Ag/AgCl (Pt)	0,03
AchE (ee) + ChOD Imobilizare pe PVA-SbQ	650 mV vs. Ag/AgCl (Pt)	2,8

AChE: acetilcholinesteraza; BSA: albumina serică bovină; BuChE: butirilcolinesterază;
ChOD: colin oxidază; hs : ser de cal; PVA-SbQ: alcol polivinilic conţinând grupe de stirilpiridiniu.

Tab. 4.5 Electrozi monoenzimatici bazaţi pe detecţia amperometrică (oxidarea tiocolinei).

Modul de imobilizare al enzimei	Potenţial	Limita de detecţie a paraoxonului (ppb)
BuChE (hs) / legare încrucişată cu glutaraldehidă	250 mV faşă de Ag/AgCl (electrod de cărbune modificat cu CoPC)	0,08
AchE sau BuChE (hs)/legare încrucişată cu glutaraldehidă	300 mV faţă de Ag/AgCl (electrod de cărbune modificat cu CoPC)	1,5
AChE şi/sau BuChE (hs) / legare încrucişată cu BSA şi glutaraldehidă	250 mV faţă de Ag/AgCl (electrod de grafit modificat cu CoPC)	2,8
AChE / imobilizare în grafit-epoxi	700 mV faţă de Ag/AgCl	28
AchE / imobilizare în PVA-SbQ	410 mV faţă de . Ag/AgCl (Pt)	0,03
AchE (be) sau BuChE (hs) Imobilizare pe particule de siliciu aminate în epoxi-grafit	300 mV faţă de Ag/AgCl (electrod de grafit modificat cu TCNQ)	27,5
AChE / imobilizare în PVA-SbQ	410 mV faţă de SCE (Pt)	0,3

AChE: acetilcolinesteraza; be: eritrocite de bovină; BSA: albumină serică bovină;
BuChE: butirilcolinesteraza; CoPC: cobalt ftalocianină; hs: ser de cal; ns: nespecificat;
PVA-SbQ: alcol polivinilic conţinând grupe de stirilpiridiniu; TCNQ: tetracianoquinodimetan.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În acest fel, potențialul este mai mic decât cel folosit pentru oxidarea H_2O_2 descrisă anterior (410 mV în loc de 650 mV față de Ag/AgCl și platină). Deasemenea, este posibilă obținerea de rezultate similare prin folosirea mediatorilor cum ar fi TCNQ sau CoPC. Astfel, prin legarea încrucișată a BuChE cu glutaraldehida pe suprafața unui electrod de carbon modificat cu cobalt ftalocinainã (CoPC) s-au putut detecta 0,08 ppb paraoxon. Folosindu-se AChE imobilizată pe o matrice de PVA-SbQ, limita de detecție pentru paraoxon a fost de 0,03 ppb. Unele dintre aceste studii au fost validate cu succes folosindu-se metodele cromatografice. Au fost descrise deasemenea instrumente monoenzimatice folosindu-se 4-aminofenil acetatul ca substrat; în aceste cazuri detecția s-a efectuat prin oxidarea 4-aminofenolului la un potențial de 0,25 V față de SCE pe suprafața unui electod de cărbune sticlos. Prin intermediul acestor electrozi, este posibilă obținerea unei limite de detecție de 1,1 ppb paraoxon. Este de notat și faptul că indoxil acetatul a fost folosit ca substrat, iar detecția amperometrică s-a bazat pe oxidarea albului de indigo la 0,3 V față de Ag/AgCl. În acest caz, s-a folosit butiril colinestreraza în soluție.

În concluzie, pot fi realizați biosensori prin co-imobilizarea a două colinestraze diferite pe același suport, fapt care prin comparație cu senzorii care folosesc o singură colinesterază specifică, conduce la creșterea numărului de pesticide care pot fi detectate, mărindu-se în acest mod domeniul compușilor care pot fi determinați.

Una din principalele cerințe în vederea detecției inhibitorilor este necesitatea reactivării enzimei inhibate în scopul realizării unor determinări continue. După cum s-a arătat, în cazul inhibitorilor ireversibili ai colinesterazei, cum sunt insecticidele organofosforice, reactivarea enzimei este realizată prin folosirea unui agent puternic nucleofilic cum este fi 2-PAM sau TMB-4.

Un alt mod de determinare se bazează pe utilizarea elctrozilor "screen printed" modificați cu TCNQ ca mediator redox, care permit aplicarea unui potențial mai puțin oxidant (100 mV față de Ag/AgCl); prin aceasta scad totodată și interferențele posibile existente în probele reale.

$$\text{Tiocolina (red)} + \text{TCNQ (ox)} \longrightarrow \text{tiocolina (ox)} + \text{TCNQ (red)} + 2\,H^+$$

$$\text{TCNQ (red)} \xrightarrow{\text{100 mV față de Ag/AgCl}} \text{TCNQ (ox)} + 2\,e^-$$

Determinarea activității rămase după incubarea cu inhibitor permite calcularea procentului de inhibiție (% I) care este corelat cu concentrația inhibitorului. Electrozii "screen printed" modificați cu AchE prezintă o bună stabilitate și reproductibilitate a determinărilor. Stabilizarea curentului de bază și a timpului de răspuns au fost de până la 2-3 minute.

Există posibilitatea comparării gradului de inhibiție a enzimei libere din soluție (caracterizată prin constanta de inhibiție, k_i) și sub formă imobilizată (caracterizată prin valoarea I_{50}, concentrația de inhibitor pentru care se obține 50% din inhibiție). Așa cum se poate observa în tabelul 4.6, enzimele își păstrează sensibilitatea față de inhibitori chiar și atunci când sunt sub formă imobilizată. Valorile raportului k_i și I_{50} variază (cresc sau descresc) în același mod. Este important de notat că printre enzimele modificate, unele sunt de 100 ori mai sensibile față de insecticide și deci este posibilă folosirea acestora în construcția biosenzorilor pentru detecția pesticidelor în concentrații foarte mici. Enzimele modificate, permit detecția unor concentrații de până la 0,5 ppb paraoxon și carbofuran.

Electrozii "screen printed" modificați cu AchE sunt electrozi de unică folosință , produși in masă, la un preț de cost scăzut și ușor de reprodus. Insectcidele organofosforice și carbamate sunt compuși hidrofobi care necesită solvenți organici pentru extracția și concentrarea lor. În prezent se studiază inhibiția în medii organice, incluzând atât solvenții solubili în apă (etanol) cât și insolubili în apă (hexan).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tab. 4.6 Comparaţia valorilor $k_{i(wt)}/k_{i(m)}$ determinate pentru enzimele libere şi a valorilor I_{50} (ppb) determinate pentru enzimele imobilizate.Raportul $k_{i(wt)}/k_{i(m)}$ unde $k_{i(wt)}$, reprezintă enzima brută şi $k_{i(m)}$, reprezintă enzima mutantă m.

	Paraoxon			carbofuran	
	$K_{i(wt)}/k_{i(m)}$	I_{50}(ppb)		$K_{i(wt)}/k_{i(m)}$	I_{50}(ppb)
F368W	74	>10	F368L*	4.42	>10
WT	1	7.5	F368W	3.33	8.8
Y408F	0.43	1	WT	1	1
F368L*	0.42	2.1	Y408F	0.57	0.7

*Exemplu, F368L corespunde enzimei mutante în care fenilalanina din poziţia 368 a fost înlocuită de către leucină, acest fapt conducând la formarea unei enzime modificate mult mai sensibilă faţă de paraoxon (raportul $k_i < 1$) şi mult mai rezistentă la acţiunea carbofuranului (raportul lui $k_i > 1$)

În acest scop se foloseşte o metodă în două etape (figura 4.17): inhibiţia colinesterazei de către pesticide este realizată în solvent organic în timp ce activitatea remanentă este măsurată în tampon. Se poate nota faptul că, folosirea etanolului ca solvent permite măsuratori atât a activităţii enzimatice cât şi a inhibiţiei în acelaşi mediu organic. Prin intermediul acestei metode în două etape este posibilă detecţia a 1,4 ppb paraoxon, inhibiţia realizându-se în etanol sau în amestec hexan/apă (80/20).

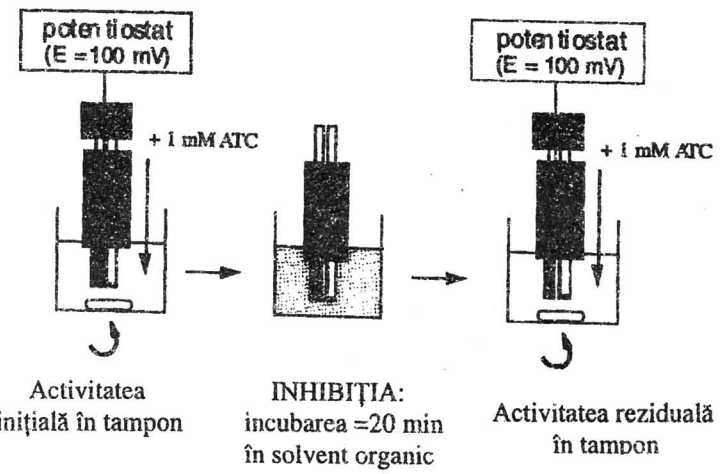


Fig 4.17 Măsurători în două trepte ale inhibiţiei/activităţii

Iniţial electrodul (un sistem de doi electrozi, indicator şi referinţă) este introdus în soluţia tampon şi este conectat la un potenţiostat; se determină activitatea iniţială (răspunsul faţă de o soluţie de acetilcolină 1 mM). Ulterior electrodul este deconectat, iar inhibiţia este realizată prin introducerea electrodului timp de 20 min. într-o soluţie de insecticid preparată în solvent organic. În final, electrodul este conectat la potenţiostat iar activitatea reziduală este determinată în soluţie tampon (răspuns fată de soluţia de 1mM acetilcolină). În final se determină procentul inhibiţiei.

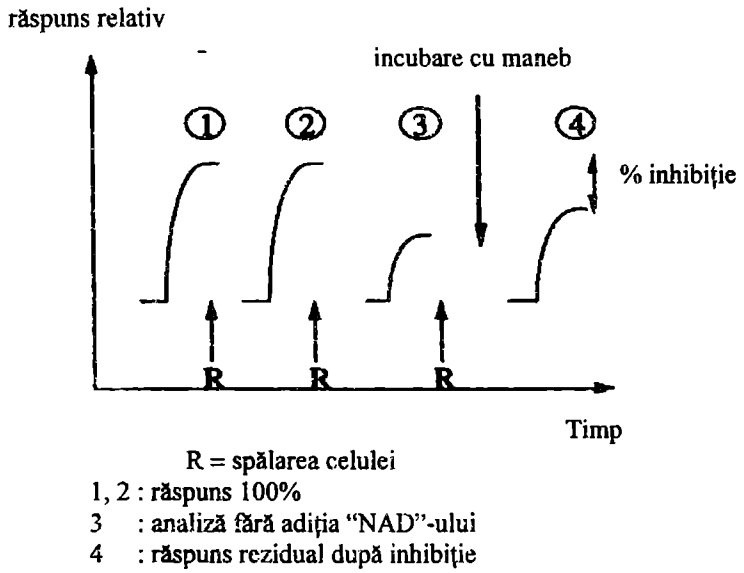
4.3.2 DETERMINAREA FUNGICIDELOR DITIOCARBAMATE

Biosensorul bazat pe aldehid-dehidrogenază (AlDH) este utilizat in detecţia fungicidelor ditiocarbamate, deoarece s-a dovedit că aceşti compuşi sunt potenţili inhibitori ai AlDH.. Sărurile etilenbisditiocarbamate cum ar fi maneb, zineb şi mancozeb sunt componenţi majori ai fungicidelor ditiocarbamate. În ciuda toxicităţii lor scăzute aceşti compuşi sunt potenţiali agenţi cancerigeni şi mutageni. Maneb, zineb şi mancozeb sunt incluse într-o listă de priorităţi a Comisiei Europene

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

pentru pesticidele care sunt folosite într-o cantitate mai mare de 50 tone pe an în lume şi care pot fi regăsite în apa din sol. Metoda clasică de determinare a acestor compuşi este bazată pe o hidroloză preliminară a compusului în urma căreia rezultă disulfura de carbon. Acest compus poate apoi fi detectat folosind metode spectrometrice sau cromatografice.

Pentru detecţia funcigidelolr ditiocarbamate s-a realizat un biosensor bazat pe asocierea aldehid dehidrigenazei si diaforezei. Diaforaza reoxidează NADH-ul la NAD^+ cu reducerea concomitentă a fericianurei la ferocianură. Ferocianura produsă este apoi oxidată la un potenţial scăzut (250 mV vs SCE) la suprafaţa unui electrod de platină. Când în mediu este prezent un inhibitor al aldehid dehidrogenazei, activitatea AlDH descreşte, conducând la o scădere a raspunsului senzorului. Metoda de măsurare a ditiocarbamaţilor este redată în figura 4.18. După stabilizaraea curentului de bază, reacţia este iniţiată prin adaugare de NAD^+ şi aldehidă propionică. În scopul eliminării influenţei NAD^+ existent în stratul sensibil se realizează o determinare ulterioară, efectuată în absenţa NAD^+. Incubarea cu inhibitor se efectuează pe o perioadă definită de timp, reacţia fiind iniţiată prin adaugarea de NAD^+ si aldehidă propionică. Procentul de inhibiţie este determinat prin compararea răspunsului senzorului înainte si după inhibiţie.



R = spălarea celulei
1, 2 : răspuns 100%
3 : analiză fără adiţia "NAD"-ului
4 : răspuns rezidual după inhibiţie

Fig.4.18 Metoda de măsurare a ditiocarbamaţilor

Sensibilitatea senzorului a fost optimizată prin descreşterea cantităţii de enzimă imobilizată şi prin creşterea timpului de incubaţie cu pesticid. În figura 4.19 se poate observa că pe masură ce cantitatea de enzimă este redusă, viteza inhibiţiei creşte. De exemplu, pentru o concentraţie de 13 ppb maneb se obţine 20% inhibiţie, pentru un senzor care conţine 80 mUI de enzimă si 65% pentru un senzor conţinând 16 mUI.

Pe de altă parte, mărind timpul de contact între pesticid si senzor se poate mări sensibilitatea. De exemplu, folosind 16mUI de enzimă, la o concentraţie de 7 ppb maneb se obţine 20% inhibiţie, pentru un timp de incubare de 2 minute şi 55 % pentru un timp de incubare de 10 minute.

Concentraţia cea mai mică de maneb detectată cu ajutorul senzorului a fost de 1,5 ppb. Prin comparaţie, metoda gaz-cromatografică permite detectarea a 20 ppb, iar cromatografia de lichide de înaltă performasnţă a 200 ppb, în timp ce metodele standard spectrometrice permit detectarea numai a 400 ppb.

Metoda bazată pe biosenzori este mult mai sensibilă şi simplă comparativ cu alte metode. Unul dintre dezavantajele metodei constă în faptul că inhibiţia aldehid dehidrogenazei este

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ireversibilă. Acest neajuns poate fi înlăturat prin folosirea electrozilor pe bază de pastă de carbon, care sunt de unică folosinţă şi au un preţ de cost scăzut.

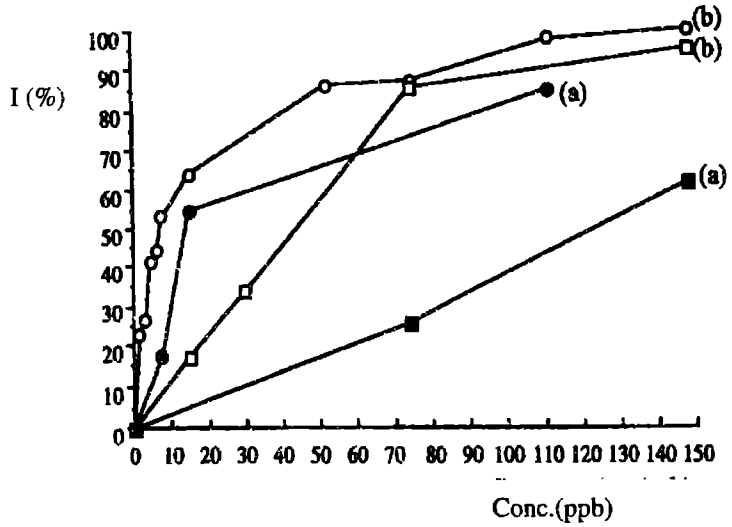


Fig.4.19. Influenţa concentraţiei de enzimă şi a timpului de incubare asupra sensibilităţii biosezorului faţă de maneb; (a) timpul de incubare 2 min. (•)0.016 UI, (■) 0.080 UI timpul de incubare 10 minute (o) 0.016 UI ( ) 0.080 UI

Un alt inconvenient al metodei este legat de solubilitatea scăzută a acestor compuşi în apă şi în solvenţi organici, ceeeace face dificilă atât extracţia cât şi detecţia acestora.. S-a sugerat mărirea solubilităţii fungicidelor etilenbis-ditiocarbamate prin transformarea pesticidelor într-o formă disodică foarte solubilă. Aceasta se poate realiza prin pretratarea lor cu o sare disodică a acidului etilendiaminotetraacetic în condiţii slab bazice (Figura 4.20).

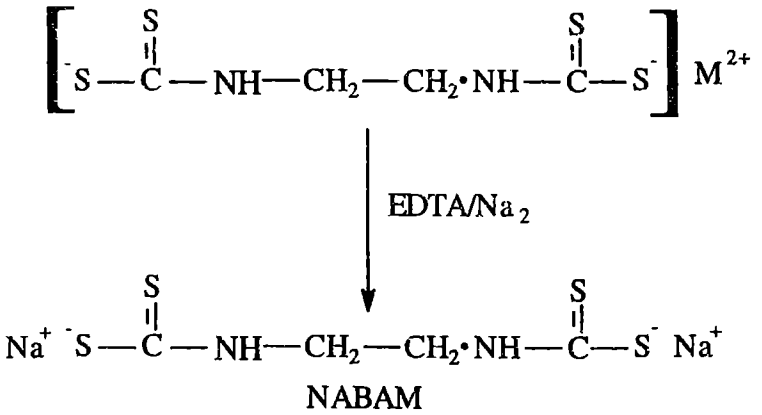


Figura 4.20 Transformarea etilenbis-ditiocarbamaţilor în sărurile sodice (nabam) prin intermediul EDTA.

În afara obţinerii unei solubilităţi mari, această formă disodică corespunde compusului nabam, care este un alt fungicid etilenbis-ditiocarbamat cunoscut ca inhibitor al aldehid dehidrogenazei. Întrucât nabamul este un pesticid disponibil comercial, este posibilă folosirea acestui compus ca pesticid de referinţă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

5. BIOSENSORI. APLICAȚII ANALITICE

Proiectarea, construcția și caracterizarea biosensorilor constituie o problemă de mare actualitate pe plan mondial, aceasta datorându-se în principal aplicațiilor multiple ale acestor noi instrumente analitice.

Evoluția biosensorilor, s-a datorat în mare parte progreselor înregistrate în cadrul a două domenii de înaltă tehnologie și anume: biotehnologia și electronica. Diversificarea cercetărilor din domeniul biotehnologiei, a condus la necesitatea realizării unor tehnici îmbunătățite de detecție, incluzând și metodele bazate pe biosensori. Noile produse rezultate din cercetările biotehnologice impuneau un control riguros al acestora, pe de o parte, precum și optimizarea proceselor fermentative și biochimice, pe de altă parte, lucru care poate fi realizat prin intermediul biosensorilor. Deasemenea, computerizarea sistemelor instrumentale simple a condus la creșterea capacității de procesare a unui număr mare de date. Din acest moment s-a simțit nevoia diversificării sensorilor, aceștia urmând să corespundă necesităților impuse de computerizare.

Sensorii, sunt dispozitive care sesizează variația unor parametri din sistem prin emiterea de semnale corespunzătoare, corelate cu mărimea (intensitatea) parametrului respectiv. Se mai numesc și *traductori*, după funcția lor de a transforma anumiți parametri ai sistemului în mărimi de altă natură. Sensori care emit un semnal corelat cu concentrația unei specii din proba de analizat se numesc *sensori (traductori) chimici.* Dacă semnalul de ieșire al unui traductor analitic este de natură electrică, dispozitivul respectiv se numește *traductor electrochimic* sau *sensor electrochimic.*

Biosensorii pot fi definiți în modul cel mai simplu ca: *"instrumente analitice care transformă activitatea biologică într-un semnal cuantificabil "* [12]. Aceștia constau dintr-un sistem de doi traductori în contact direct (figura 5.1), și anume:

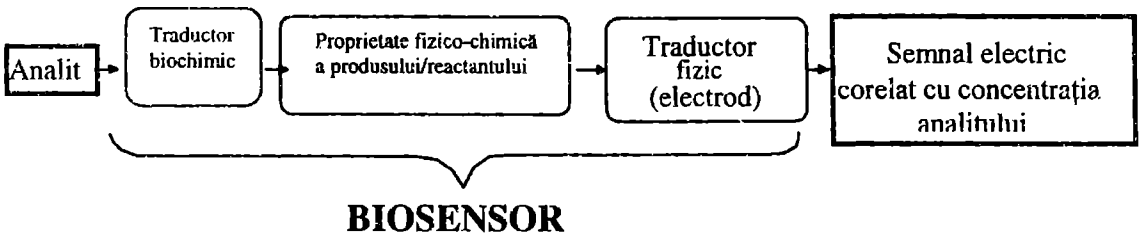


Fig. 5.1 Reprezentarea schematică a unui biosensor [13]

unul *biochimic* (responsabil pentru selectivitatea instrumentului analitic) și unul *fizic* (responsabil pentru sensibilitatea acestuia) și care corelează concentrația compusului de analizat cu un semnal electronic.

Dintre traductorii *biochimici* cel mai adesea se utilizează enzimele, dar și imunoagenți, chemoreceptori, țesuturi și organite celulare și chiar microorganisme intacte.

Dintre traductorii *fizici* pot fi menționați cei electrochimici, piezoelectrici, termistorii, cei optoelectronici ș.a. (tabelul 5.1).

În paralel cu extinderea cercetărilor din domeniul biosensorilor, s-a intensificat și cercetarea în domeniul electrozilor chimic modificați. Acest domeniu de cercetare este

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

atractiv datorită multiplelor lui aplicaţii [14]. Un aspect interesant din acest domeniu, îl reprezintă faptul că suprafaţa electrodului poate fi modificată chimic, în mod selectiv, în scopul utilizării acestora în cadrul unor determinări practice specifice. Cercetările din acest domeniu vor conduce la noi direcţii în proiectarea şi realizarea biosensorilor.

Tab. 5.1. Componente utilizate în construcţia biosensorilor[12]

Traductori biochimici	Traductori fizici
Organisme	Potenţiometrici
Ţesuturi	Amperometrici
Celule	Conductometrici
Organite	Impedimetrici
Acizi nucleici	Optici
Enzime	Calorimetrici
Componente enzimatice	Acustici
Receptori	
Anticorpi	

Biosensorii clasici convenţionali, sunt construiţi folosindu-se tehnologia "bulk" în care componentele individuale sunt asamblate fizic. Acest mod de construcţie al electrozilor, este limitat la două suprafeţe dimensionale, astfel încât, fiecare sensor trebuie construit individual. Inconvenientele acestei tehnologii clasice, sunt legate, în primul rând, de faptul că este foarte dificilă realizarea optimizării micromediului suprafeţei, biosensorii astfel realizaţi fiind greu de miniaturizat. Deasemenea, membranele, relativ groase, impun procese complexe şi lente de difuzie astfel încât reactanţii să reacţioneze cu enzima, precum şi pentru ca produşii de reacţie să ajungă la suprafaţa electrozilor. Vitezele de difuzie mici afectează timpul de răspuns al electrozilor, şi deci rapiditatea determinărilor. În plus, pentru sensorii având la bază procese lente şi complexe de difuzie, vitezele de difuzie trebuie să rămână constante pentru ca altfel calibrarea şi mai important, păstrarea calibrării, sunt dificil de realizat. Un număr de factori pot influenţa vitezele de difizie precum şi performanţele stratului enzimatic şi în final caracteristicile de răspuns ale sensorilor. Datorită celor menţionate mai sus, rezultă clar faptul că în general, construcţia majorităţii biosensorilor este dificil de realizat. În concluzie, se poate afirma că tehnologia "bulk" nu corespunde tendinţelor actuale de miniaturizare şi microelectronizare a sensorilor. Miniaturizarea biosensorilor este un aspect critic în aplicaţiile acestor instrumente "*in vivo*" în domeniul clinic.

Microelectronica este strâns legată de miniaturizare datorită circuitelor electrice de dimensiuni reduse şi a electronicii generate de tehnologia semiconductorilor. Scopul final pentru reunirea dintre biosensori şi microelectronică este realizarea unui "biocip" (adică integrarea unui sistem de biosensori cu un "micro-cip" pentru a rezulta un sistem bioelectric), în cadrul căruia sensori multipli şi procesarea electronică electrochimică se găsesc pe acelaşi "cip". În mod ideal o astfel de tehnologie ar produce un "biocip" miniaturizat multisensor, care ar putea fi produs în masă, la un preţ de cost scăzut. În perspectivă, biosensorii vor necesita un control intenţionat al structurii moleculare a suprafeţei, pentru a se realiza aplicaţii specifice. Microstructura suprafeţei va deveni în perspectivă din ce în ce mai complicată şi odată cu optimizarea acesteia, ea va putea îndeplinii o funcţie specifică.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

5.1. BIOSENSORI CLASICI

Tendinţele actuale de dezvoltare ale biochimiei analitice se caracterizează şi prin utilizarea pe scară largă a metodelor electrochimice, a procedeelor care au la bază detectarea şi prelucrarea unui semnal de natură electrică. Un astfel de semnal apare în urma interacţiei sistemului analitic cu semnalul de excitare aplicat sistemului, el fiind corelat cu natura, calitatea şi cantitatea componenţilor de determinat. Dacă semnalul de excitare este de natură electrică, astăzi, după natura sistemului de analizat, se folosesc funcţii de timp ale curentului sau ale tensiunii foarte diferite şi complexe. În general se aleg acele forme de curent sau de potenţial care asigură o selectivitate şi o sensibilitate maximă.

Biosensorii, reprezintă una dintre cele mai interesante combinaţii între reacţiile chimice, având la bază biocatalizatori şi deterimările chimice bazate pe electrozi. Biocatalizatorul este fixat pe suprafaţa electrodului, el facând posibilă reacţia unei molecule organice (substrat) în cadrul careia se consumă sau se produce o specie chimică electroactivă, care poate fi masurată prin intermediul unui sensor electrochimic:

$$\text{SUBSTRAT} \xrightarrow{\text{BIOCATALIZATOR}} \text{PRODUŞI DE REACŢIE}$$

În construcţia biosensorilor clasici au fost utilizaţi atât sensori potenţiometrici cât şi amperometrici; legat de acest aspect, în literatura de specialitate au apărut o serie de reviuri şi monografii.

În acelaşi scop, au fost utilizaţi şi diferiţi biocatalizatori şi anume: enzime, organite celulare, ţesuturi, precum şi celule bacteriene intacte. S-a arătat că, în unele cazuri, ultimele tipuri de biocatalizatori prezintă o serie de avantaje comparativ cu folosirea sistemelor enzimatice, în special în condiţiile în care enzima respectivă nu poate fi uşor izolată. Folosirea biocatalizatorilor în cadrul determinarilor analitice, face ca reacţia să aibă loc în condiţii blânde de temperatură şi pH, la concentraţii mici de substrat.

Urmărirea electrochimică a reacţiilor având la bază biocatalizatori, conduce deci la o tehnică eficace cu un consum mic de reactivi, care prezintă multiple aventaje.

Din cele expuse mai sus, se poate afirma că o direcţie principală de studiu din domeniul bioelectrochimiei analitice o prezintă realizarea şi caracterizarea sensorilor cu membrană biocatalitică (biosensorilor).

Biosensorii şi-au găsit aplicaţii în domeniul chimiei analitice, clinice, a mediului înconjurător, alimentare, agrochimiei, biochimiei şi biofizicii. Pe lângă faptul că prin intermediul acestora pot fi determinate substanţe biochimice importante, cum sunt: proteinele, enzimele, precum şi diferiţii metaboliţi rezultaţi sau utilizaţi în cadrul proceselor biochimice din organism, biosensorii pot fi folosiţi şi-n detectarea unor intermediari instabili, rezultaţi din reacţii sau procese metabolice, putându-se astfel observa modificările în mecanismele reacţiilor biochimice, ceea ce în final, poate conduce la elucidarea lor.

În perspectivă, biosensorii îşi vor găsi din ce în ce mai multe aplicaţii în controlul analitic al proceselor chimice sau biotehnologice; informaţia obţinută rapid şi continuu prin intermediul acestora va putea fi folosită pentru menţinerea parametrilor caracteristici ai unui proces pe un domeniu optim.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

5.1.1. PRINCIPIUL DE CONSTRUCȚIE ȘI FUNCȚIONARE AL BIOSENSORILOR

Biosensorul este un instrument analitic care are la bază un material biologic sensibil (traductor biochimic) prin intermediul căruia se pot detecta specii biochimice sau chimice în mod direct fără o prelucrare complexă a probei. Acesta este realizat prin fixarea traductorului biochimic pe suprafața unui traductor fizic adecvat care are rolul de a transforma semnalul biochimic (răspunsul biochimic) într-un semnal analitic cuantificabil și procesabil. Deci biosensorii sunt instrumente anlitice constând din două traductoare biochimic și fizic în contact direct și care corelează concentrația compusului de analizat cu un semnal electric (figura 5.2.).

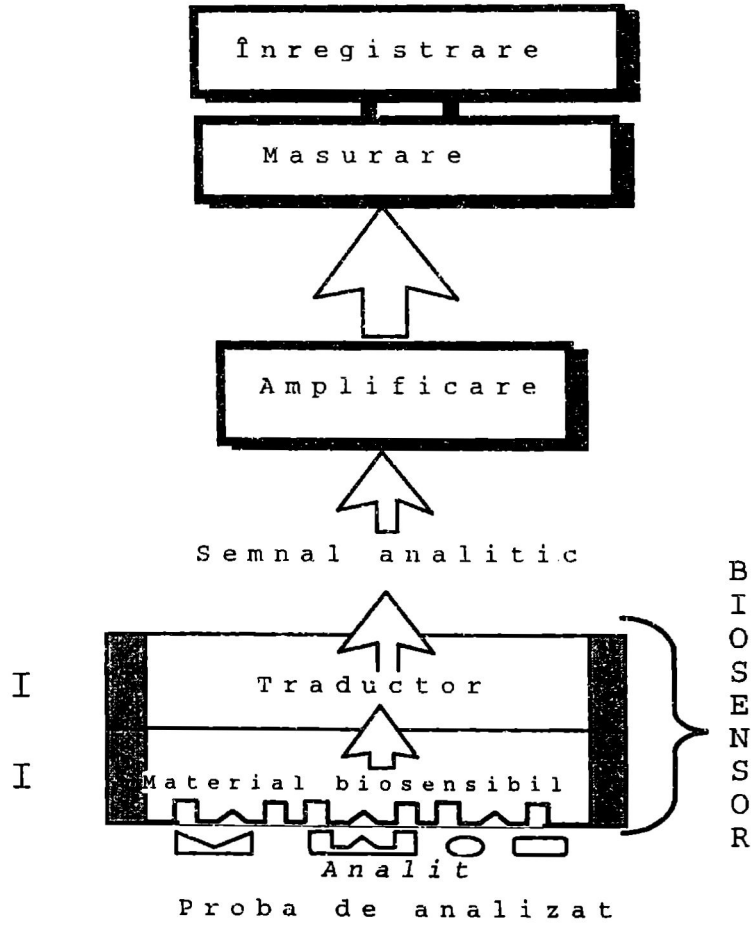


Fig. 5.2 Principiul constructiv și de funcționare al unui biosensor

Traductorul biochimic este responsabil pentru recunoașterea moleculară specifică a compusului de analizat; este evident din reprezentarea schematică a biosensorului (figura 5.2.), că recunoașterea moleculară a compușilor de analizat în amestecul de reacție se realizează pe principiul "cheii" și "lacătului" (principiul complementarității structurale) între componenta biochimică și compusul chimic de determinat.

Principiul de funcționare al unui biosensor se bazează pe difuzia substratului spre suprafața detectorului, unde are loc inițial interacția cu traductorul biochimic (enzime,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

microorganisme, ţesuturi, etc.); dacă componenta biochimică (molecule biochimice) interacţionează specific şi reversibil cu compusul chimic de determinat (substrat), apare o modificare a unuia sau a mai multor parametrii fizico-chimici asociaţi cu această interacţie. În urma acestei interacţii pot apărea modificări ale masei, de temperatură, generare de ioni, electroni, lumină sau degajare de gaze. Aceste cantităţi sunt transformate într-un semnal analitic de către traductorul fizic, amplificate, procesate şi afişate într-o formă adecvată.

În tabelul 5.2, sunt prezentate diferitele tehnici utilizate pentru măsurarea semnalului analitic şi deci care pot detecta cantităţile menţionate mai sus, precum şi diferitele tipuri de substanţe care pot fi determinate.

Tab. 5.2 Tipuri de traductori utilizaţi în construcţia biosensorilor

TRADUCTOR	TIP DE DETERMINARE	APLICAŢIE
1. Electrometric		
a) conductometric	Conductanţa	Reacţii catalizate enzimatic
b) electrod enzimatic	Amperometrică (curent)	Substrat enzimatic, sisteme imunologice (Ag/Ac)
c) electrod ion-selectiv (EIS)	Potenţiometrică (tensiune)	Ioni în medii biologice, substrate enzimatice, imunoelectrozi
d) tranzistor cu efect de câmp (FET)	Potenţiometrică (tensiune)	Ioni, gaze, substrat enzimatic, sisteme imunologice
e) electrod gaz-sensibil	Potenţiometrică (tensiune)	Gaze, enzime, organite celulare, electrozi ţesut
Impedimetric	Impedanţa	Imunosensor enzimatic
2. Optoelectronic fibre optice, dispozitive cu ghid de undă	Optic	Substrat enzimatic, analiţi imunologici
3. Cristale piezoelectrice	Diferenţă de masă	Substanţe uşor volatile, analiţi imunologici
4. Termistori	Termometrie / calorimetrie	Enzime, celule, ţesut, gaze, poluanţi, antibiotice, vitamine, analiţi imunologici

Alegerea traductorului şi construcţia de bază a biosensorului trebuie să îndeplinească o serie de caracteristici dintre care se menţionează următoarele:

- selectivitate ridicată faţă de compusul de analizat;
- să răspundă liniar pe un anumit domeniu de concentraţii relevant pentru proba analizată;
- să prezinte un timp de răspuns şi de revenire rapid (circa 1-3 minute);
- să poată fi miniaturizat ;
- să poată compensa (intern) deplasarea determinată de temperatură sau de alţi factori;
- să prezinte reproductibilitate în condiţiile aplicaţiilor practice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Deoarece componenta biochimică este responsabilă de recunoaşterea compusului de analizat dintr-un amestec complex, aceasta determină selectivitatea sensorului, fiind parţial responsabilă şi de sensibilitatea acestuia. De cele mai multe ori selectivitatea biocomponentului este micşorată de traductorul fizic.

Traductorul fizic transformă semnalul biochimic într-un semnal electronic, fiind resposabil de sensibilitatea acestuia. Există o varietate mare de traductori fizici, iar dintre aceştia trebuie ales cel care este cel mai adecvat măsurării modificării proprietăţii fizice sau chimice rezultate în sistem. Dintre traductorii fizici se pot menţiona cei electrochimici, optici, termici, piezoelectrici (tabelul 5.2). În prezent sunt utilizate şi evaluate diferite tehnici de măsurare a răspunsului precum şi diferite tipuri de traductori fizici. Dintre traductorii menţionaţi cel mai adesea în practică se folosesc sensorii amperometrici şi potenţiometrici. Aceşti sensori pot constitui o alternativă puternică şi ieftină la tehnologiile convenţionale permiţând identificarea substanţelor de analizat în prezenţa a numeroşi compuşi interferenţi.

Biosensorii prezintă o serie de caracteristici unice cum sunt: forma compactă, uşurinţa (simplitatea) în utilizare, posibilitatea realizării analizei într-o singură etapă fără un consum adiţional de reactivi, absenţa radioactivităţii.

În tabelul 5.3, se redau o serie de substanţe (compuşi de analizat) a căror determinare este frecvent întâlnită în literatura de specialitate şi care pot fi dozaţi prin intermediul unor biosensori de specificitate şi selectivitate adecvată.

Tab. 5.3 Compuşi de dozat [13]

Compuşi	Exemple
Gaze anestezice	N_2O
Gaze respiratorii	CO_2, O_2
Gaze inflamabile	CH_4
Gaze toxice	CO, H_2S,Cl_2, NH_3
Metaboliţi	Glucoză, uree
Metaboliţi în urme	Hormoni,steroizi,
Ioni	H^+, Li^+, Na^+, K^+, Ca^{2+}, $PO^{3-}{}_4$
Ioni ai metalelor grele	Pb^{2+}, Hg^{2+}, Cu^+, Cd^{2+}
Vapori organici toxici	Benzen, toluen
Proteine,acizi nucleici	AND, ARN, cazeina
Microorganisme	Viruşi, bacterii

5.1.2 DEFINIŢIA BIOSENSORILOR

Conform definiţiei IUPAC, un biosensor este un instrument analitic integrat şi compact, capabil de a genera informaţii analitice cantitative sau semi-cantitative specifice, el fiind realizat prin cuplarea directă a unui bioreceptor (componenta biochimică) cu un traductor fizic. Se recomandă deasemenea, a se face o distincţie clară între biosensor şi sistem bioanalitic, sistem care necesită de obicei o serie de etape adiţionale de prelucrare a probei cum ar fi adăugarea de reactivi. În plus, biosensorul

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

trebuie delimitat de bioprobă care în general este de unică folosinţă, sau nu poate fi utilizată în monitorizarea continuă a concentraţiei compusului de determinat.

Biosensorii pot fi clasificaţi funcţie de componenta biochimică sau funcţie de traductorul fizic utilizat în construcţia acestuia (figura 5.3).

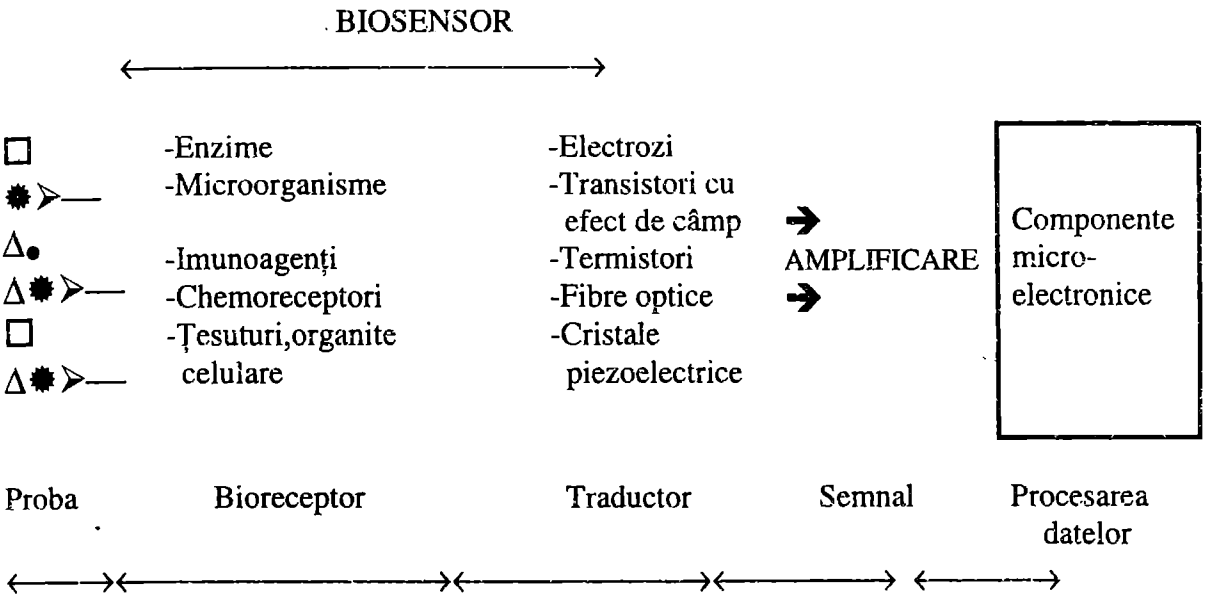


Fig. 5.3 Reprezentarea schematică a unui biosensor incluzând diferitele componente biochimice şi diferiţii traductori fizici care pot fi utilizaţi în construcţia acestora [12]

Dintre biosensorii realizaţi până în prezent, numai cei enzimatici amperometrici şi potenţiometrici au fost comercializaţi restul aflându-se în stadiul de cercetări fundamentale aşa cum rezultă şi din tabelul 5.4.

Tab. 5.4 Stadiul actual al cercetarilor în domeniul biosensorilor [(x) cercetări fundamentale, (xx) cercetări fundamentale şi realizări de prototipuri,(xxx) cercetări fundamentale şi instrumente comercializate] [12].

Biosensor ---------- Traductor		Enzima	Celule, Micro-Organisme	Imuno-Agent	Ţesut Animal/ Vegetal	Chemo-receptor
Celula Electro chimică	Ampero-metrică	x x x	x x	x x	x	
	Ponteţio-Metrică	x x x	x x	x x	x	X
Semiconductor (ISFET)		x x		x		
Termistor		x		x		
Fotometric (fibre optice)		x		x		
Piezoelectric (cuarţ)		x		x		
Chemomecanic		x				

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

5.1.3. DEZVOLTAREA ISTORICĂ A CONCEPTULUI DE BIOSENSOR

Este binecunoscut faptul că domeniul sensorilor bazaţi pe recunoaştere fizică este mult mai dezvoltat comparativ cu cel al sensorilor bazaţi pe recunoaştere chimică. În ultimii 35 de ani, s-a dezvoltat un nou concept de sensor bazat pe recunoaştere biochimică denumit *biosensor*, în construcţia căruia se utilizează molecule biochimice în contact intim cu un traductor fizic.

În prezenţa unui substrat care poate fi recunoscut de componenta biochimică se obţine un semnal care poate fi detectat prin intermediul unui traductor fizic, semnal corelat ulterior cu concentraţia substratului.

Enzimele au fost des utilizate împreună cu diferiţii electrozi în scopul realizării *electrozilor enzimatici*; majoritatea *electrozilor enzimatici* realizaţi au avut la bază detectori electrochimici comercializaţi, prin intermediul cărora se urmăreşte variaţia concentraţiei reactanţilor sau a produşilor implicaţi în reacţia enzimatică şi astfel în mod indirect se determină concentraţia substratului enzimatic.

În anul 1962, Clark şi Lyons [15] au fost primii cercetători care au descris conceptul de biosensor. Ei au studiat posibilitatea utilizării unor membrane conţinând enzime specifice pentru transformarea ureei sau glucozei în produşi detectabili prin intermediul unui sensor de pH, sau pentru oxigen. Autorii, au realizat un sensor pentru glucoză, obţinut prin imobilizarea glucoz-oxidazei (Gox) în gel de poliacrilamidă şi fixarea preparatului enzimatic obţinut pe suprafaţa unui sensor pentru oxigen, realizând astfel un contact intim cu sensorul de oxigen (figura 5.4). Electrodul de oxigen este un sensor amperometric care măsoară intensitatea curentului care traversează celula atunci când între cei doi electrozi (catod metal nobil –Au sau Pt şi anod Ag) se aplică o diferenţă de potenţial (-0,6 V) [16]. În absenta glucozei electrodul raspunde faţă de concentraţia de oxigen din soluţie. Prin adăugarea glucozei oxigenul din soluţie este consumat în cadrul reacţiei de oxidare enzimatică a glucozei la acid gluconic şi deci mai puţin oxigen ajunge la suprafaţa sensorului. Aceasta se traduce printr-o scădere a curentului observat (înregistrat); mărimea acestei modificări în curent este corelată cu concentraţia de glucoză.

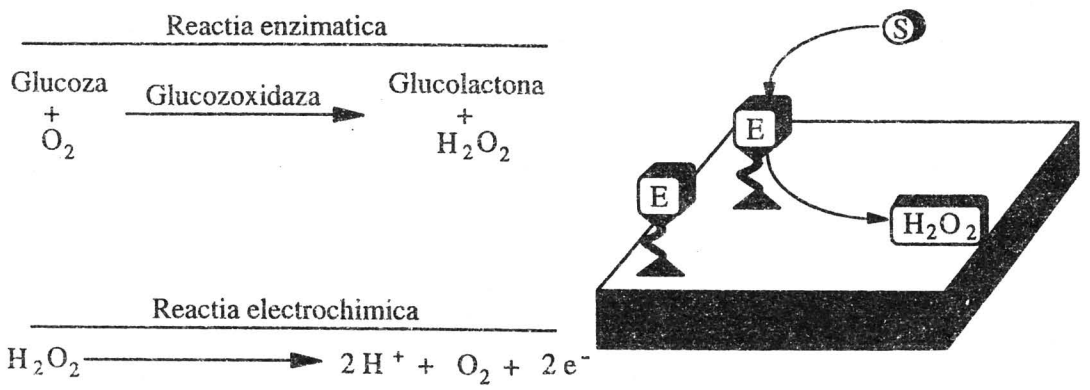


Fig. 5.4 Reprezentarea schematică a sensorului enzimatic clasic pentru glucoză (R.Clark, C.Lyons) [15].

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Ulterior în anul 1967, Updike şi Hicks [17] au preluat acest concept, l-au dezvoltat şi au introdus termenul de *"electrod enzimatic"*, pentru a descrie noul instrument analitic. Această descoperire a reprezentat un pas decisiv în analiza biochimică. Astfel s-a creat o nouă clasă de sensori numită *biosensori* (sau sensori de membrană biocatalitici). Aceştia au rezultat prin asocierea dintre sensorii existenţi cum ar fi cei amperometrici, potenţiometrici, termici, piezoelectrici, acustici şi optici şi sistemele biologice cum ar fi enzimele, celulele, microorganismele, receptorii chimici şi agenţi imunologici.

Interesul asupra domeniului electrozilor enzimatici a crescut mult în ultimii ani; astfel de la primele publicaţii ale lui Guilbault [18], care a realizat un electrod enzimatic potenţiometric pentru determinarea ureei, în literatura de specialitate au apărut mii de articole legate de realizarea, caracterizarea şi utilizarea practică a biosensorilor în determinarea diferitelor substrate. Toate acestea au condus începând cu anii 1980, la apariţia unuei reviste internaţionale de specialitate intitulată *"BIOSENSORS"*.

Lucrările de pionerat ale lui Clark şi Lyons, respectiv Updike şi Hicks au stimulat progresul în utilizarea enzimelor imobilizate în cadrul analizei chimice. Modul de realizare al primului sensor de glucoză este simplu drept concept, dar are şi unele dezavantaje, dintre care cel mai notabil este dependenţa răspunsului de concentraţia de oxigen. De-a lungul anilor, s-au făcut diferite încercări pentru a se minimaliza sau îndepărta acestă dependenţă; de exemplu recent Gough şi colab. [19] au propus o nouă variantă de construcţie a electrodului enzimatic pentru glucoză în care geometria electrodului a fost astfel proiectată încât O_2 poate ajunge la suprafaţa sensorului pentru oxigen atât prin difuzie axială cât şi radială, în timp ce glucoza poate ajunge numai prin difuzie axială. Prin acest mod de construcţie transportul de masă al oxigenului este mult mărit comparativ cu cel al glucozei şi astfel problemele legate de concentraţia de O_2 sunt minimalizate dar nu rezolvate.

Metodele electrochimice bazate pe electrozi enzimatici implică în mod frecvent măsurarea fie a consumului de oxigen utilizând un electrod de tip Clark, fie formarea de H_2O_2 utilizând un electrod de Pt. În ultimul caz este necesară aplicarea unui suprapotenţial (+ 0,7 V), potenţial la care unele specii, cum ar fi acidul ascorbic şi acidul uric, sunt deasemenea electroactive. Efectul acestor interferenţi determină o dificultate majoră în analiza unor probe biologice fără o pretratare prealabilă a probei.

5.1.4. APLICAŢIILE BIOSENSORILOR

Proiectarea, construcţia şi caracterizarea biosensorilor constituie o problemă de mare actualitate pe plan mondial, aceasta datorându-se în principal aplicaţiilor multiple ale acestor noi instrumente analitice în diferite domenii cum sunt: chimie, biochimie, controlul proceselor tehnologice şi biotehnologice, medicină, agricultură, industria alimentară, mediul înconjurător, apărare şi securitate. În tabelul 5.5 sunt redate aplicaţiile biosensorilor în diferitele domenii.

Numărul compuşilor chimici şi biochimici care pot fi determinaţi prin intermediul biosensorilor este în continuă creştere, fapt datorat în principal folosirii pe scară largă a ţesuturilor vegetale şi animale, a microorganismelor intacte, a enzimelor solubile sau imobilizate, în realizarea acestor instrumente analitice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Biosensorii şi-au găsit largi aplicaţii în determinările clinice, biomedicale şi farmaceutice, ei fiind utilizaţi tot mai mult pentru determinarea unor metaboliţi importanţi cum ar fi: glucoza, ureea, glutationul, colesterolul, alcoolul, aminoacizii, hemoglobina, etc. Domeniul biomedical constituie potenţiala piaţă de comercializare a biosensorilor, datorită în principal posibilelor aplicaţii ale acestor instrumente în special în scopul menţinerii sănătăţii. În prima fază, a fost realizat electrodul bazat pe glucoz-oxidază (Gox), pentru determinarea glucozei din sânge şi urină, pentru diagnosticarea diabetului. Acesta a fost urmat de electrodul pentru lactat, realizat în scopul evaluării efortului muscular şi de electrozii pentru uree şi creatinină, pentru controlul funcţiilor renale. O serie de alţi biosensori au la bază, fie enzime, fie anticorpi, pentru determinarea neurotransmiţătorilor, hormonilor şi a altor metaboliţi importanţi.

Tab. 5.5 Aplicaţii posibile ale biosensorilor [12]

Domeniul	Aplicaţii
Clinic/medical	Analiza medicamentelor, analiza sângelui, monitorizarea medicamentelor terapeutice, diagnostice clinice
Industrial	Procese biotehnologice şi fermentative, procese industriale şi alimentare, controlul calităţii, detecţia contaminanţilor, analiza apei şi apelor uzate, detecţia unor produşi/subprodusi toxici, testarea produselor cosmetice
Agricultură/veterinar	Diagnosticarea bolilor la plante şi animale, detecţia compuşilor toxici, testarea calităţii solului şi apei, măsurarea necesarului biochimic de oxigen, controlul calităţii produselor vegetale şi animale, monitorizarea păstrării lor în timp.
Securitate/apărare	Detecţia substanţelor chimice dăunătoare şi agenţilor biologici, incluzind explozivi, gaze de luptă, micotoxine, viruşi, bacterii patogene şi toxine biologice.
Mediu	Detecţia unor compuşi chimici toxici în apă, aer, sol, detecţia contaminarii personale.
Robotică	Instrumente senzoriale pentru construcţia unor sisteme automate care funcţionează în medii ostile, în mediu casnic şi sănătate.

Biosensorii implantabili au, de asemenea, aplicaţii în domeniul biomedical aceştia putând fi implantaţi în regiuni precise ale organismului uman, fără a fi necesară o extracţie sau un consum de lichide biologice. Astfel, se pot obţine rezultate imediate, care sunt extrem de utile în condiţiile impunerii unor decizii rapide, spre exemplu în cazul operaţiilor. În viitor, biosensorii vor putea fi utilizaţi în controlul şi reglarea medicamentelor din organismul uman.

Există, de asemenea, o mare cerinţă pentru biosensori în industria alimentară, în scopul urmăririi diferitelor etape de producţie şi de control al calităţii produsului final.

Electrodul de glucoză este folosit pentru urmărirea procesului de fermentaţie, cel de lactat pentru controlul calităţii laptelui şi iaurtului, iar cel de etanol pentru evaluarea concentraţiei de alcool în băuturile alcoolice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Electrozii microbieni, pot contamina proba prin eliberarea microorganismului în mediul de determinare. Ei sunt utili, totuşi, în controlul poluării mediului (cum ar fi estimarea poluării organice). Prin intermediul lor se poate determina necesarul biochimic de oxigen, care nu necesită procedee selective. Toxicitatea totală a unor compuşi chimici poate fi măsurată prin urmărirea inhibiţiei unei enzime specifice (acetil-colinesteraza) imobilizate pe suprafaţa unui electrod. Biosensorii enzimatici pe bază de colinesterază reproduc inhibiţia enzimatică din corpul uman şi detectează compuşii organofosforici prezenţi ca agenţi poluanţi în mediu. Biosensorii pot genera informaţii continue asupra stării mediului înconjurător şi reprezintă buni înlocuitori pentru testele biologice care utilizează specii vii, precum peştii.

Alţi biosensori aflaţi în studiu la ora actuală vizează detecţia agenţilor biologici, cum ar fi virusii, bacteriile şi substanţele toxice, care sunt incluşi în compoziţia unor arme bacteriologice.

În ultimii ani combinarea cunoştiinţelor din electrochimie, biochimie, fizică şi tehnologia circuitelor integrate a condus la realizarea unor biosenzori foarte specifici sensibili, selectivi şi precişi. În perspectivă, pe plan mondial se întrevede posibilitatea comercializării biosensorilor în domeniile prezentate mai sus; în tabelul 5.6 se redă comparativ evoluţia comercializării acestora în decursul anilor.

Tab. 5.6 Comercializarea pe plan mondial a biosensorilor [12].

Domeniul	1990	1995	2000
		Milioane $	
Diagnostic clinic	20	85	450
Analize industriale	3	20	145
Agricultură/veterinar	2	50	100
Apărare	2	15	85
Instrumente medicale	5	25	50
Mediu	2	20	35
Robotică	1	5	10
Diverse	-	10	20
TOTAL	35	240	895

În anul 1987 piaţa comercială a biosensorilor a fost de 25 milioane $, dintre care vânzările în domeniul clinic, biomedical şi al sănătătii cifrându-se la aproximativ 10 milioane $. Într-un studiu de prospectare al pieţii în domeniul comercializării biosensorilor, pentru anul 2000, prognoza specialiştilor prevede o creştere a vânzărilor redată în tabelul 5.6.

5.2 TEHNICI DE IMOBILIZARE A BIOCOMPONENŢILOR PE SUPRAFAŢA SENSORILOR

În mod clasic biosensorii se realizează prin "tehnologia bulk" discutată anterior, în care componenţii individuali sunt fizic asamblaţi.

Caracteristicile de răspuns ale biosensorilor depind în principal de modul de realizare al legării (cuplării) dintre componenta biochimică şi suprafaţa traductorului

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

electrochimic, deci de imobilizare a biocomponentului. Aspectele detailate legate de imobilizarea biocomponenţilor pe diferite suporturi şi suprafeţe au fost discutate în capitolul 1. Biocomponenţii, cel mai adesea utilizaţi în construcţia biosensorilor sunt enzimele şi deci se vor trata pe scurt, în special imobilizarea acestora; multe dintre metodele şi tehnicile relative la imobilizarea enzimelor sunt general aplicabile pentru majoritatea biocomponenţilor.

Prin imobilizare enzimele pot fi uşor separate din amestecul de reacţie şi refolosite. În plus, printr-un control adecvat al micromediului din vecinătatea enzimei imobilizate şi printr-o modificare chimică a suprafeţei de electrod, intenţionată, raţională şi stabilă se pot obţine proprietăţi dorite ale acestor instrumente analitice cum ar fi: o stabilitate crescută, o sensibilitate mărită, răspuns rapid, posibilitatea utilizării lor în analiza în flux (FIA), flexibilitate în alegerea dimensiunilor şi formei electrodului, posibilitatea miniaturizării acestuia, sau folosirea unor suprafeţe complexe cum este RVC-ul (electrodul reticulat de cărbune vitros) şi prevenirea acoperirii suprafeţei cu compuşi nedoriţi, sau precipitate, precum şi eliminarea unor interferenţe posibile.

Prin studii teoretice, Mell şi Melloy [20] au demonstrat faptul că, curentul stării staţionare pentru biosensorii amperometrici este determinat în mare măsură de aria efectivă a electrodului, de grosimea membranei şi de concentraţia de enzimă imobilizată activă. Din aceste studii a rezultat că biosensorii amperometrici având la bază straturi enzimatice subţiri dar foarte active pot conduce la performanţe optime din punctul de vedere al răspunsului şi al sensibilităţii.

După cum s-a arătat (vezi paragraful 1.4) există diferite procedee de imobilizare a componenţilor biochimici pe suprafaţa sau în imediata vecinatate a traductorului fizic. Multe dintre proprietăţile biosensorilor depind de metoda de imobilizare. Termenul de imobilizare a enzimelor se referă la procesul de localizare fizică a moleculelor de enzimă, pentru a fi utilizate în cadrul unui proces catalitic continuu.

Prin ajustarea factorilor de mediu ale enzimei imobilizate acestea sunt plasate într-un mediu mai apropiat de cel natural, ceea ce face ca ele să prezinte o stabilitate mărită în timp faţă de variaţiile de temperatură, pH, tărie ionică, sau faţă de acţiunea diferiţilor inhibitori. În scopul imobilizării enzimelor se utilizează două tehnici majore şi anume: chimice şi fizice (discutate la paragraful 1.4).

În istoria electrozilor enzimatici, în general enzimele au fost imobilizate în membrane hidrofile, ulterior ele fiind fixate pe suprafaţa unui electod. În mod firesc, primele metode de fixare au presupus o reţinere fizică, în scopul unei menţineri pe cât mai mult posibil a integrităţii sistemului biologic.

La sfârşitul anilor '70, enzimele au fost direct imobilizate pe suprafaţa unui electrod, fie prin adsorbţie, prin legare covalentă, entrapare, legare încrucişată sau prin electropolimerizare.

Imobilizarea enzimelor este o etapă de maximă importanţă în construcţia biosensorilor. Atâta timp cât enzimele rămân active imobilizarea acestora permite folosirea lor repetitivă putându-se astfel realiza determinări multiple [21].

Imobilizarea a mai mult de o enzimă pe un acelaşi suport, a reprezentat un alt pas important în dezvoltarea sensorilor enzimatici. O singură enzimă nu este întotdeauna suficientă pentru a transforma substanţa de studiat într-o formă detectabilă de către traductorul fizic. Adesea, este necesar să se folosească mai multe enzime pentru a se realiza o serie de transformări, astfel încât produsul primei reacţii devine substrat pentru a

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

doua, ş.a.m.d. Încorporarea mai multor enzime în acelaşi sensor prezintă următoarele avantaje: transformarea compusului de analizat prin intermediul unei secvenţe de reacţii într-o formă detectabilă electrochimic, minimalizarea interferenţelor posibile din proba de analizat, posibilitatea refolosirii reactanţilor.

Imobilizarea mediatorilor redox a fost realizată recent. Aceşti compuşi cum sunt ferocenii sau sărurile organice conductoare tetraciano-chinodimetan (TCNQ) pot fi imobilizate pe suprafaţa unor polimeri conductori cum este polipirolul. Mediatorii, în general, au rolul de a reoxida chimic cofactorii enzimatici eliminând astfel dependenţa sensorilor enzimatici de concentraţia de oxigen [22,23]. În cazul sensorului enzimatic pentru glucoză fără mediatori, oxigenul, fiind acceptorul natural pentru electroni ai reacţiei catalizate de glucoz-oxidază, este esenţial pentru regenerarea cofactorului (FAD) pe parcursul oxidarii glucozei. Folosirea mediatorilor reprezintă o contribuţie importantă în analiza biomedicală, în special în cadrul măsurătorilor "in vivo" unde concentraţia de oxigen este variabilă. În situaţia în care se folosesc mediatori redox în construcţia biosensrilor, aceştia pot funcţiona şi în absenţa oxigenului, ceeace este important pentru studiul proceselor fermentative anaerobe. Regenerarea mediatorilor necesită totuşi electrozi amperometrici care generează curentul necesar pentru reoxidarea cofactorului.

5.3 ELECTROZI ENZIMATICI BAZAŢI PE TRADUCTORI ELECTROCHIMICI

Sensorii electrochimici sunt traductori care transformă parametrul concentraţiei într-o mărime de natură electrică: curent, potenţial de electrod, rezistenţă, conductivitate, impedanţă, etc. În funcţie de natura semnalului de ieşire, se deosebesc trei mari categorii de sensori electrochimici: potenţiometrici, amperomertici şi conductometrici. Dintre aceştia, în continuare vor fi descrişi sensorii potenţiometrici şi sensorii amperometrici, deoarece, aceştia sunt cei mai utilizaţi în construcţia biosensorilor.

Utilizarea sensorilor electrochimici în construcţia biosensorilor oferă o serie de avantaje dintre care se menţionează: sensibilitate ridicată, domeniul mare de linearitate, metodele în care se utilizează preupun folosirea unor volume mici de probă, preţ de cost scăzut, posibilităţi de utilizare în cadrul metodelor FIA şi " *in vivo* " , de miniaturizare, oferă posibilitatea studierii şi determinării oricărei specii electrochimic active, prezintă un caracter nedistructiv asupra probelor.

În cazul sensorilor potenţiometrici interfaţa, măsoară concentraţia stării staţionare a unor specii rezultate din reacţia enzimatică. Concentraţia stării stationare este cinetic determinată şi depinde de transportul de masă a substratului sau produsului de reacţie spre suprafaţa sensorului şi în masa soluţiei precum şi de concentraţiile lor iniţiale. În plus, în cazul sensorilor enzimatici potenţiometrici este importantă asigurarea unei cinetici rapide şi existenţa unui potenţial de referinţă stabil.

În cazul sensorilor electrochimici amperometrici, se urmăreşte în mod direct viteza reacţiei enzimatice prin măsurarea curentului. Un rol important în funcţionarea acestora îl are şi transportul de masă al substratului precum şi potenţialul impus electrodului care poate influenţa cinetica reacţiilor de electrod (reacţiile lente pot fi accelerate prin mărirea potenţialului).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În general, comparându-se biosensorii amperometrici şi cei potenţiometrici, din punctul de vedere al caracteristicilor de răspuns, rezultă că primii prezintă o serie de avantaje comparativ cu ceilalţi.

Potenţiometria este o tehnică la care curentul se menţine constant şi se măsoară diferenţa de potenţial dintre doi electrozi care este o funcţie logaritmică de activitatea ionilor din soluţie. În cadrul metodelor amperometrice de analiză se aplică un anumit potenţial între electrozi şi se măsoară curentul care este o funcţie liniară de concentraţia speciei reacţionate la interfaţa electrodului în solutie.

Relaţia între aceste două metode vine de la faptul că orice celulă electrochimică este caracterizată printr-o funcţie de trei variabile (la temperatură şi presiune constantă): potenţialul, curentul şi activitatea speciilor chimice din soluţie.

Biosensorii sau sensorii cu membrană catalitică sunt instrumente analitice în care un biocatalizator (enzimă, sisteme multienzimatice, componente membranare, fracţiuni subcelulare sau organite celulare, ţesuturi, celule bacteriane intacte) este fixat pe suprafaţa unui sensor electrochimic, el făcând posibilă reacţia unei molecule organice (substrat) în cadrul căreia se consumă sau se produce o specie chimică electroactivă ce poate fi măsurată prin intermediul sensorului electrochimic. În figura 5.5 este redată reprezentarea schematică a unui biosensor.

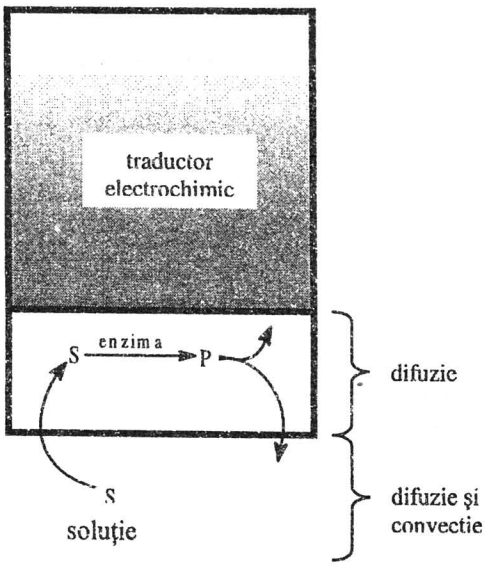


Fig. 5.5 Reprezentarea schematică a principiului de construcţie şi funcţionare al unui electrod enzimatic

Deoarece componenta biolochimică (enzima) este responsabilă pentru recunoaşterea compusului de analizat, ea este cea care determină gradul de selectivitate al metodei analitice. Practic are loc o reacţie catalizată enzimatic, în cadrul căreia se consumă sau se produce o specie chimică electroactivă, care poate fi detectată prin intermediul sensorului. Deci, enzima catalizează reacţia ce permite determinarea substratului sau a efectorilor.

Traductorul electrochimic este cel care converteşte semnalul biochimic într-un semnal electronic, care poate fi procesat şi măsurat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Există în prezent două tendinţe principale pentru realizarea biosensorilor. Una dintre acestea constă în utilizarea enzimelor izolate, sau a unor sisteme enzimatice care conduc la reacţii catalizate enzimatic cuplate.

Cea de a doua constă în utilizarea unor complexe biocatalitice, incluzând celule bacteriene şi fragmente de ţesuturi animale şi vegetale, care înlocuiesc enzimele izolate. În cazul biosensorilor având la bază organite celulare, ţesuturi sau celule bacteriene intacte, activitatea biocatalitică se datorează unei enzime sau complex enzimatic localizat în interiorul materialului biocatalitic [24].

În tabelul 5.7 sunt redate diferitele tipuri de biocatalizatori care stau la baza construcţiei biosensorilor clasici, prezentându-se totodată şi câteva dintre avantajele sau dezavantajele folosirii acestora.

Tab.5.7 Principalele tipuri de biocatalizatori utilizaţi în construcţia biosensorilor.

Nr.crt.	Biocatalizator	Avantaje	Dezavantaje
1.	Enzimă izolată	Selectivitate şi activitate mare	Utilizare şi stabilitate limitată
2.	Secvenţă enzimatică	Posibilităţi multiple de imobilizare, mărirea gamei de compuşi detectabili	Creşterea interferenţelor, probleme legate de optimizarea condiţiilor de lucru
3.	Microorganisme	Varietate mare, simplitate în construcţie, posibilităţi de regenerare	Selectivitate redusă, Timp mare de răspuns
4.	Ţesut animal sau vegetal	Simplitate în construcţia biosensorului,creşterea gamei de compuşi detectabili	Creşterea interferenţelor, timp mare de răspuns

Un electrod enzimatic clasic este obţinut prin depunerea pe suprafaţa oricărui tip de sensor electrochimic a unui strat enzimatic, cu condiţia ca sensorul să facă posibilă detecţia fie a substratului fie a produsului reacţiei catalizate enzimatic. În construcţia acestor electrozi enzima poate fi utilizată într-o formă solubilă sau imobilizată.

Enzimele nu au putut intra mai rapid în practica analitică datorită dezavantajelor pe care acestea le prezentau, şi anume:

- instabilitate pe parcursul folosirii şi păstrării;
- activitate enzimatică variabilă atât pe parcursul păstrării cât şi folosirii lor în cadrul procedeelor analitice;
- condiţii de lucru speciale;
- nu se pot obţine într-o stare de puritate analitică;
- timp mare de analiză;
- nu puteau fi refolosite sau utilizate în sisteme în flux;
- preţ de cost foarte ridicat.

Enzimele suferă procesul de denaturare, proces care apare prin modificarea unor parametrii chimici şi fizici ai mediului în care acestea sunt introduse. După cum s-a arătat în capitolul 2, enzimele prezintă un pH, o temperatură şi o tărie ionică a mediului optime de funcţionare. Enzimele sunt termolabile, temperatura optimă pentru majoritatea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

enzimelor fiind sub 40°C; deasemenea, ele funcţinând în organismul uman pH-ul optim al majorităţii lor este în jurul valorii pH-ului fiziologic. Datorită modificărilor de temperatură, pH şi a altor factori apare o modificare a structurii enzimelor care poate conduce la denaturarea reversibilă sau ireversibilă a acestora. Dacă condiţiile externe în care sunt menţinute enzimele se modifică o perioadă scurtă de timp şi nu foarte drastic, procesul denaturării este reversibil, înţelegând prin aceasta că o dată cu refacerea condiţiilor optime de mediu acetea îşi recapătă activitatea enzimatică.

O posibilă stabilizare a structurii enzimatice se realizează prin imobilizare; cel mai adesea, în construcţia electrozilor enzimatici clasici imobilizarea enzimelor sa realizat prin fixarea acestora într-un gel, care a fost depus şi fixat pe suprafaţa electrodului prin intermediul unei membrane semipermeabile.

Electrozii enzimatici reprezintă instrumente analitice selective şi sensibile, fapt datorat specificităţii şi capacităţii catalitice a enzimelor care intră în componenţa lor. Datorită acestui fapt, ei sunt utili în determinarea multor compuşi chimici de importanţă biochimică.

În general, pentru construirea unui sensor enzimatic sunt necesare a fi parcurse următoarele etape:

- alegerea unei enzime care să interacţioneze cu compusul de determinat;
- obţinerea enzimei;
- imobilizarea enzimei;
- fixarea enzimei imobilizate pe suprafaţa electroactivă a unui electrod indicator convenabil ales, care să permită urmărirea desfăşurării reacţiei catalizate enzimatic.

Principiul general constructiv al acestora a fost redat în figura 5.5. Suprafaţa sensorului este în contact direct cu stratul enzimatic şi se presupune că la această interfaţă nu există transport de masă. Sensorul enzimatic se introduce în soluţia conţinând substratul de determinat; acesta migrează în stratul enzimatic unde are loc reacţia catalizată enzimatic, în urma căreia rezultă poduşii de reacţie. Pentru ca reacţia să decurgă rapid spre echilibru este necesar ca membrana enzimatică să fie cât mai subţire. Deasemenea este necesar ca soluţia să fie bine agitată astfel încât să se asigure un transport eficient al substratului. Schematic principiul de funcţionare al unui electod enzimatic presupune o serie de etape [25]:

i) transportul substratului la suprafata electrodului ;
ii) difuzia substratului prin membrană în stratul enzimatc;
iii) reacţia enzimatică;
iv) transportul produşilor reacţiei enzimatice spre suprafaţa electrodului;
v) măsurarea produşilor de reacţie la suprafaţa electrodului.

Viteza primului proces depinde de viteza de agitare a soluţiei, astfel încât o agitare puternică face ca substratul să ajungă rapid la suprafaţa electrodului. Dacă membrana este foarte subţire, etapele ii) şi iv) pot fi eliminate sau minimalizate. Deoarece etapa iii) este foarte rapidă răspunsul teoretic al electrodului enzimatic ar trebui să fie aproximativ acelaşi cu cel al electrodului folosit.

Baza difuzională a mecanismului de răspuns este corelată cu procesul stării staţionare. Deci la suprafaţa electrodului se acumulează o concentraţie fixă de specii electroactive răspunsul electrodului fiind corelat cu concentraţia substratului din masa soluţiei. Stabilirea unei stări staţienare este deci esenţială pentru obţinerea unui răspuns

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

precis. Cinetica procesului de stabilire a stării staţionare , care reprezintă timpul necesar atingerii unei acestei stării depinde de foarte mulţi parametrii, care nu sunt discutaţi în acest capitol.

Problema centrală a folosirii electrozilor enzimatici, ca şi în cazul oricărui sensor chimic este problema selectivităţii acestuia. Contribuţia majoră la selectivitatea sensorului, dar nu unica, este cea generată de către componenta biochimică.

Cercetările iniţiale în domeniul biosensorilor au avut la bază studierea posibilităţilor utilizării numai a unei singure enzime depuse pe suprafaţa electrodului. Dacă enzima respectivă prezintă o activitate mare, o selectivitate bine definită, stabilitate pentru un timp relativ lung şi poate fi folosită în condiţii comparabile cu cerinţele traductorului electrochimic, există posibilitatea proiectării unui sensor cu caracteristici de răspuns foarte bune. În practică există un număr redus de sensorii care să întrunească toate aceste criterii dintre care se amintesc electrozii enzimatici pentru glucoză, aminoacizi şi nucleotide. Construcţia electrozilor enzimatici este limitată de numărul sensorilor comercializţi şi nu de enzime deoarece numărul acestora din urmă este foarte mare.

Un biosensor cu o stabilitate mare poate fi realizat prin folosirea enzimelor artificiale (sinzime). În acest sens în literatura de specialitate există însă un număr relativ mic de exemple. Deasemenea folosirea enzimelor cuplate este o altă soluţie în mărirea gamei de electrozi enzimatici care pot fi realizaţi şi care pot conduce la mărirea numărului de compuşi detectabili.

5.3.1 ELECTROZI ENZIMATICI POTENŢIOMETRICI

Sensorii potenţiometrici sunt traductori concentraţie-potenţial, care în condiţii bine determinate generează un potenţial reversibil, determinat de o anumită specie prezentă în sistem. Dacă curentul este zero, semnalul de ieşire depinde numai de compoziţia mediului cu care sensorul este în contact. Potenţiometria, este o metodă electrochimică bazată pe măsurarea unei diferenţe de potenţial între un electrod de lucru şi un electrod de referinţă (care are un potenţial constant şi repreductibil, independent de condiţiile de mediu).

Potenţialul electrodului de lucru reprezintă potenţialul la interfaţa dintre fazele solidă şi lichidă unde apar reacţiile de oxido-reducere. De exemplu la interfaţa dintre un conductor metalic şi soluţia unui cuplu redox apare o reacţie de schimb de electroni între conductor şi compuşii care se oxidează şi/sau reduc.

Echilibrul se realizează atunci când viteza de oxidare şi reducere sunt egale şi compoziţia soluţiei din jurul electrodului este constantă. Potenţialul de echilibru este dat de relaţia lui Nernst:

$$\varepsilon = \varepsilon^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_{ox}}{C_{red}}$$

în care C_{ox} şi C_{red} reprezintă concentraţia formei oxidate şi respectiv reduse din sistem.

Relaţia lui Nernst este valabilă numai în cazul soluţiilor diluate. Odată cu creşterea concentraţiei ionice sistemul se deplasează faţă de condiţiile termodinamice ideale şi concentraţia, C, trebuie înlocuită cu activitatea, a:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

$$a = \gamma c$$

unde γ este coeficientul de activitate.

În funcţie de tipul purtătorului de sarcină schimbat la interfaţă se deosebesc electrozi ionici sau redox. Determinarea potenţialului de electrod, generează o indicaţie directă asupra concentraţiei speciei de analizat, semnalul obţinut fiind proporţional cu logaritmul concentraţiei .

După cum s-a menţionat potenţialul electrodului este măsurat faţă de un electrod de referinţă. Aceşti electrozi au (generează) un potenţial constant în diferite soluţii de electroliţi de diverse compoziţii, astfel încât orice modificare în măsurarea potenţialului se datorează numai proceselor care apar la suprafaţa electrodului de lucru (indicator) sau electrodului sensibil. Electrozii de referinţă cel mai des folosiţi sunt electrozii de calomel şi cei de argint/clorură de argint. Pentru a se genera un potenţial de referinţă, conform reacţiilor de electrod corespunzătoare ambelor sisteme, concentraţia clorurii trebuie menţinută constantă:

$$Ag(s) + Cl^- \leftrightarrow AgCl(s) + e^-$$

$$2\,Hg(l) + 2Cl^- \leftrightarrow Hg_2Cl_2(s) + 2e^-$$

Acest criteriu este îndeplinit prin păstrarea unei concentraţii constante a ionilor de clorură în soluţie, sau prin separarea semicelulei de referinţă de electrolitul de studiat prin intermediul unei diafragme. Trebuie menţionat că separarea celor doi electroliţi determină apariţia unui potenţial de difuzie, care conduce la o serie de erori în măsurarea potenţialului dacă pH-ul şi compoziţia celor două soluţii sunt foarte diferite. În literatură sunt descrise o serie de metode de a minimaliza influenţa acestui potenţial de joncţiune asupra măsurătorilor de potenţial [26].

În cazul măsurătorilor practice de potenţial, electrozii indicator (sensibil) şi de referinţă sunt conectaţi la un voltmetru digital cu rezistenţă de intrare mare ($Z>10\ G\Omega$) care permite măsurarea diferenţei de potenţial şi la un circuit electric care amplifică semnalul.. Potenţialele standard de electrod sunt măsurate faţă de electrodul standard de hidrogen (SHE) iar în tabelul 5.8 sunt prezentate valorile acestora pentru diferiţi electrozi.

Tab 5.8 Potenţialul unor electrozi de referinţă faţă de potenţialul electrodului standard de hidrogen [25]

Electrozi	Potenţialul faţă de SHE (V)
Ag/AgCl, KCl(sa)	+0.197
Ag/AgCl, KCl(1mol/l)	+0.236
$Hg(Hg_2Cl_2, KCl)(sa)$	+0.241
Hg/Hg_2Cl_2, KCl(1mol/l)	+0.280
Hg/Hg_2SO_4, H_2SO_4(0.5mol/l)	+0.679

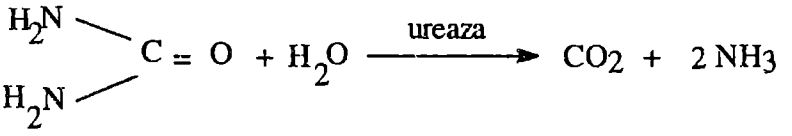
Dintre sensorii potenţiometrici, electrozii ion selectivi şi sensorii de gaz au fost cel mai adesea utilizaţi în construcţia biosensorilor. Acest lucru se datorează faptului că electrozii redox nu sunt selectivi, ceea ce determină apariţia interferenţelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Combinarea sensorilor potenţiometrici cu diverşi biocomponenţi se bazează pe posibilitatea detecţiei produşilor reacţiei biocatalitice în care sunt implicate diferite substrate. Produşii de recţie pot fi NH_3, CO_2 sau protoni. În ultimul caz, sunt detectate modificările de pH din vecinătatea electrodului de pH, rezultate în urma reacţiei enzimatice. Sensibilitatea măsurătorilor este influenţată de capacitatea de tamponare a soluţiei. Deasemenea utilizarea reacţiei enzimatice urmată de o reacţie chimică a condus la posibilitatea utilizării şi a altor electrozi ion-selectivi în construcţia biosensorilor.

Trebuie reţinut faptul că electrozii de pH de sticlă şi stibiu, sensorii de gaz pentru CO_2 si NH_3, precum şi diverşii electrozi ion-selectivi (pentru iodură, cianaură, amoniu ş.a.) au fost utilizaţi în construcţia electrozilor enzimatici datorită faptului că în cadrul multor reacţii enziamtice se consumă sau se produc specii chimice faţă de care aceşti electrozi sunt sensibili.

Electrozii pentru uree au fost printre primii sensori enzimatici potenţiometrici construiţi. Determinarea ureei din sânge şi urină se bazează pe hidroliza enzimatică a acesteia:



În domeniul de pH în care enzima este activă (pH≈7), în soluţie se stabilesc următoarele echilibre:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

$$NH_3 + H_2O \rightleftharpoons NH_4^+ + OH^-$$

Deci pentru determinarea ureei pot fi folosiţi o gamă largă de sensori potenţiometrici şi anume sensorii de gaz, electrozii amoniu-selectiv sau de pH.

Electrodul potenţiometric pentru glucoză este construit prin imobilizarea glucoz-oxidazei (Gox) pe suprafaţa unui electrod de sticlă. Enzima catalizează oxidarea glucozei la acid gluconic:

$$\text{glucoza} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Gox}} \text{acid gluconic} + H_2O_2$$

Electrodul de pH detectează variaţiile de pH care apar ca urmare a formării acidului gluconic în mediu, putându-se astfel determina în mod indirect concentraţia de glucoză.

Biosensorii aminoacid-sensibili pot avea la bază o mare varitate de enzime care catalizează oxidarea, hidroliza sau decarboxilarea aminoacizilor. De exemplu, aminoacidoxidazele (AAO) catalizează reacţia:

$$RCH(NH_3^+)COO^- + 1/2\ O_2 \xrightarrow{\text{LAAO}} R\text{-}CO\text{-}COO^- + NH_4^+$$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Utilizând enzime din această clasă se poate măsura concentrația de aminoacid amperometric – utilizând un electrod de oxigen sau potențiometric – utilizând un electrod amoniu-selectiv.

Electrozii bazați pe hidrolaze prezintă importanță practică deoarece construcția acestora nu implică utilizarea cofactorilor. Spre exemplu, β-glucozidaza catalizează hidroliza amigdalinei conform urmatoarei reacții:

$$\text{Amigdalina} \rightarrow C_6H_5\text{-CHO} + \text{-}2C_6H_{12}O_6 + HCN$$

Un electrod enzimatic amigdalin-sensibil este obținut prin simpla imobilizare a β-glucozidazei pe suprafața unui electrod cianură-selectiv [27].

Neurotransmițătorii pot fi de asemenena determinați utilizând hidrolaze. Acetilcolina este hidrolizată de acetilcolinesterază (AChE) conform reacției:

$$\text{Acetilcolina} \xrightarrow{\text{AChE}} \text{Acid acetic} + \text{colina}$$

Deci sensorul pentru determinarea acetilcolinei a fost realizat prin imobilizarea AchE pe suprafața electrodului de sticlă.

În tabelul 5.9 sunt menționați diverși electrozi enzimatici având la bază sensori potențiometrici.

Tab. 5.9 Electrozi enzimatici potențiometrici

Sensor Electrochimic	Enzima	Metabolitul	Domeniul de măsurare nmol/l
Sticlă, pH	Ureaza	Uree	0.05-5
	Glucoz-oxidaza	Glucoza	0.1-1
	Penicilinaza	Penicilina	0.01-3
	Acetilcolinesteraza	Acetilcolina	0.01-10
Sb, pH	Ureaza	Uree	0.1-10
Sensorul pentru NH_3	Ureaza	Uree	0.05-50
	Glutaminaza	Glutamina	0.05-5
	Phenilalanin-amoniu-Liaza	Phenilalanina	0.05-1
	Asparaginaza	Asparagina	0.1-10
	AMP diaminaza	5'-AMP	0.1-10
	Creatinin diaminaza	Creatinina	0.1-10
Sensorul pentru CO_2	Ureaza	Uree	0.1-10
	Uricaza	Acid uric	0.1-2.5
	Enzimele Decarboxilante	Tirozina	0.1-2.5
		Asparagina	0.1-10
		Lizina	0.1-30
		Glutamina	0.5-5
Electrod amoniu-Selectiv	Ureaza	Uree	0.01-10
	Creatininaza	Creatinina	0.01-5
	Asparaginaza	Asparagina	0.01-1

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tab.5.9. Continuare

Electrod iodură-Selectiv	Aminoacidoxidaza	Aminoacizi	0.01-10
Redox	Lactat dehidrogenaza	Lactat	0.1-1
Electrod cianură-Selectiv	β-glucozidaza	Amigdalina	0.1-100

5.3.2 ELECTROZI ENZIMATICI AMPEROMETRICI

Amperometria aparţine grupului de metode voltametrice prin care se măsoară curentul ca o funcţie de potenţialul aplicat; sensorii amperometrici sunt deci traductori concentraţie-curent. În cadrul metodelor amperometrice de detecţie potenţialul de electrod este menţinut la o valoare la care are loc conversia electrocatalitică a substanţei în soluţie, măsurându-se curentul stării staţionare. La interfaţa electrod–soluţie apare un transfer heterogen de electroni între substanţă şi electrod (oxidare-reducere). Semnalul de ieşire, curentul, este determinat de natura şi concetraţia speciei electroactive, de forma semnalului de excitare şi de modul de transport al materiei spre electrod. Acesta din urmă, depinde de forma electrodului şi de agitarea electrolitului.

Dacă unui electrod de lucru inert introdus în soluţia unui cuplu redox i se aplică un potenţial constant, se declanşează reacţia de electrod:

$$Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$$

Oxidarea sau reducerea unei specii are loc la un electrod de lucru, cel de-al doilea electrod acţionând ca electrod de referinţă. În timpul electrolizei, electrodul de lucru poate acţiona ca anod sau catod în funcţie de potenţialul aplicat.

Se consideră, că reacţia de mai sus este rapidă în comparaţie cu procesul de transport al materiei (reacţie reversibilă) şi ca atare, pe electrod se stabileşte un echilibru electrochimic.

Aplicând un potenţial constant, experimental se constată că răspunsul sistemului este apariţia unui curent având următoarele proprietaţi: este proporţional cu Cox, cu aria suprafeţei electrodului A şi descreşte cu timpul. Relaţia intensitate-concentraţie trebuie să fie în concordanţă cu aceste date experimentale.

La valori mari ale potenţialului aplicat (suprapotenţial) viteza reacţiei cu transfer de electroni este mărită astfel încât concentraţia la suprafaţă a substanţei devine egală cu zero; aceasta se datorează faptului că toate particulele transportate la suprafaţa electrodului sunt imediat transformate. În aceste condiţii curentul este limitat de difuzia substanţei prin stratul de difuzie din imediata vecinătate a electrodului (figura 5.6).

În acord cu prima lege de difuzie a lui Fick curentul este dat de relaţia:

$$I_l = nFDA\frac{C_s}{\delta}$$

unde: n, F şi D reprezintă numărul de electroni schimbaţi, constanta lui Faraday şi respectiv coeficientul de difuzie al speciei redox-active;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

A reprezintă aria electrodului;
δ reprezintă grosimea stratului de difuzie,
iar C_S este concentrația din întreg volumul de soluție.

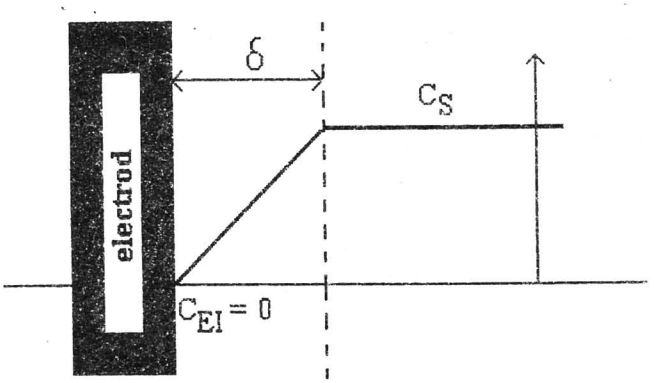


Fig. 5.6 Reprezentarea schematică a variației concentrației din stratul adiacent electrodului amperometric pentru cazul în care aceasta este limitată de difuziune (c_{el} este concentrația speciei la suprafața electrodului, C_S este concentrația totală din soluție)

Relația de mai sus se respectă numai în condițiile în care conductivitatea totală este mult mai mare decât suma, contribuțiilor la conductivitate ale speciilor ce se determină, astfel incât efectul migrării să poată fi neglijat (de exemplu prin utilizarea unor electroliți suport).

În condițiile unei convecții constante (δ=const.) se obține o dependență liniară a curentului de gradientul de concentrație de la suprafața electrodului. În general metodele amperometrice au la bază procese limitate de difuzie.

Biosensorii amperometrici au la bază un detector amperometric pe suprafața căruia se fixează o membrană enzimatică de a cărei grosime depind caracteristicile de răspuns ale acestuia. Metodele amperometrice sunt foarte sensibile, prin intermediul lor putându-se determina concentrații din domeniul milimolar sau chiar submicromolar. Sensibilitatea foarte bună, precum și timpul mic de răspuns reprezintă două avantaje majore ale traductorilor amperometrici.

Determinările amperometrice se realizează în celule electrochimice (voltametrice) de diferite configurații, două dintre acestea fiind reprezentate în figura 5.7. (celule având la bază doi și respectiv trei electrozi). În general, folosirea sistemului cu trei electrozi este mai avantajoasă deoarece prin electrodul de referință nu trece curent electric, fiind posibile astfel măsurători foarte precise la potențiale impuse bine definite. Totuși, în cazul densităților mici de curent, determinările realizate în celule avînd la bază doi electrozi sunt suficient de precise. Prin combinarea electrodului de referință cu cel auxiliar, trebuie să se asigure o rezistență electrică scăzută și o arie a suprafaței electrodului mărită pentru a se evita astfel polarizarea suprafeței electrodului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

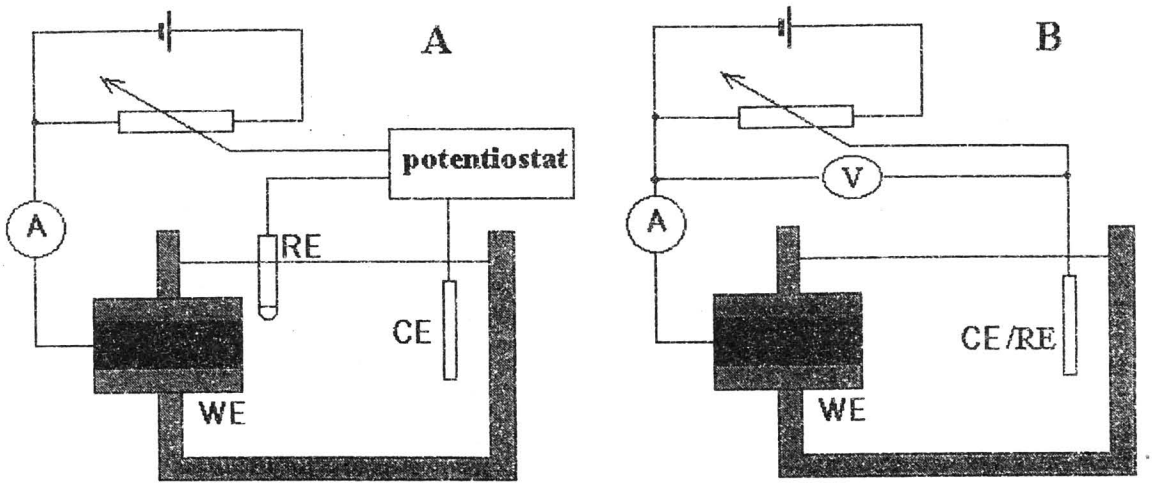


Fig.5.7 Reprezentarea schematică a motajelor voltametrice. A-celulă cu trei electrozi, B-celulă cu doi electrozi (WE-electrod de lucru, RE-electrod de referință, CE-contra electrod sau auxiliar)

Selectivitatea şi sensibilitatea determinărilor amperometrice depinde în mare măsură de potenţialul aplicat la electrodul de lucru, în condiţiile în care în soluţia probei de analizat există specii electrochimic active având potenţiale formale de oxido-reducere apropiate. Eliminarea interferenţelor poate fi realizată pe diferite căi.

Una dintre acestea constă în modificarea selectivă a materialului de electrod prin introducerea de noi grupări chimice (electrozi chimic modificaţi) care fac ca reacţia de interes să decurgă la valori de potenţiale mai mici decât ale interferenţilor posibili sau prin găsirea unor noi materiale electrodice [28].

O altă posibilitate este aceea de a folosii diferite membrane care prin fixarea lor pe suprafaţa electrodului de lucru conduc la mărirea selectivităţii acestuia prin limitarea accesului interferenţilor la suprafaţa electrodului, permiţând însă accesul compuşilor de determinat (de ex. utilizarea membranelor de nafion).

Interferenţele posibile pot fi limitate sau eliminate şi prin folosirea enzimelor, care pot cataliza reacţii de transformare a interferenţilor în produşi de reacţie electrochimic inactivi sau care suferă procese redox la potenţiale diferite de cele ale compusului de determinat.

În construcţia electrozilor enzimatici amperometrici se pot folosi o gamă restrânsă de electrozi dintre care se menţionează sensorii de oxigen, electrozii pentru apă oxigenată, cei pe bază de materiale carbonice ş.a. În acelaşi scop se folosesc enzimele din clasa oxidoreductazelor (oxidaze, dehidrogenaze şi peroxidaze) deci enzime implicate în reacţii cu transfer de electroni. În general, determinările amperometrice având la bază electrozi enzimatici au fost realizate prin măsurarea oxigenului sau a apei oxigenate care se consumă sau se formează în timpul reacţiei biocatalitice. Folosirea sensorilor amperometrici ca traductori în construcţia biosensorilor, apare un consum foarte mic al speciei electrochimice active, ceea ce reprezintă una dintre diferenţele majore faţă de utilizarea sensorilor potenţiometrici.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Sensorii amperometrici au stat la baza construcției unor biosensori pentru determinarea glucozei, polizaharidelor, alcoolilor, aminoacizilor, etc.

De exemplu glucoza a fost determinată amperometric prin intermediul unui electrod enzimatic având la bază Gox care catalizează reacția [29,30]:

$$\text{glucoza} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Gox}} \text{Acid gluconic} + H_2O_2$$

determinarea glucozei realizîndu-se indirect prin urmărirea scăderii concentrației de oxigen din sistem sau creșterii concentrației de apă oxigenată. Metoda prezintă o serie de dezavantaje dintre care cel mai semnificativ este faptul că oxigenul este limitativ de viteză, deoarece solubilitatea lui în soluție este limitată și dependentă de temperatură. Totodată, la anumite concentrații H_2O_2 poate denatura Gox, ceeace conduce la modificări ale activității acesteia care în final se traduc prin modificarea caracteristicilor de răspuns ale biosensorului enzimatic. Din acest punct de vedere se poate constata o modificare a pantei de răspuns, a stabilității precum și a reproductibilității mmăsurătorilor.

O parte din inconvenientele menționate anterior pot fi eliminate prin coimobilizarea Gox și catalazei (CAT) pe suprafața unui sensor amperometric, enzimele catalizând următoarele reacții:

$$\text{glucoza} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Gox}} \text{Acid gluconic} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{CAT}} H_2O + 1/2\ O_2$$

Din reacții, se observă că descompunerea enzimatică a H_2O_2 poate fi astfel utilizată pentru producerea a jumatate din cantitatea de O_2 consumată în prima reacție; deasemenea prin folosirea CAT se elimină influența apei oxigenate asupra Gox.Electrozii enzimatici obtinuți în acest fel pot fi utilizați în determinarea glucozei din sânge și ser și în urmarirea proceselor fermentative.

Având în vedere faptul că unul dintre produșii al reacției catalizate de Gox este apa oxigenată, dozarea glucozei se poate face și prin determinarea electrochimică a apei oxigenate:

$$H_2O_2 \xrightarrow{+600\text{ mV / vs.Ag / AgCl}} 2H^+ + O_2 + 2e^-$$

Astfel a fost realizat un analizor de glucoză având la bază doi electrozi de Pt, dintre care unul acoperit cu o membrană în care se află imobilizată enzima. Între cei doi electrozi se aplică un potențial de +600mV vs. electrod Ag / AgCl.

Aceasta a fost prima generație de biosensori amperometrici. S-au realizat numeroși astfel de biosensori care au la bază determinarea oxigenului sau a apei oxigenate. Diferența constă în geometria celulei, tehnica de imobilizare a enzimei, compoziția membranei, configurația electrodului. Deși aparent, dozarea oxigenului sau a apei oxigenate este simplă, ea prezintă o serie de limitări în cazul probelor reale. Potențialul de +600 mV vs. Ag/AgCl necesar oxidării apei oxigenate este suficient de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

pozitiv pentru a permite şi oxidarea altor specii prezente în probele biologice, apărând astfel interferenţe.

Pentru detecţia polizaharidelor sunt necesare reacţii catalizate enzimatic cuplate. Astfel, iniţial are loc hidroliza polizaharidelor până la monozaharide, având loc apoi oxidarea acestora în acord cu metodele descrise anterior. Determinarea sucrozei necesită 3 enzime: invertaza, mutarotaza şi glucoz-oxidaza. Acestea catalizează urmatoarele reacţii:

$$\text{Sucroza} + H_2O \xrightarrow{\text{invertaza}} \alpha\text{-D-glucoza} + \text{D-fructoza}$$

$$\alpha\text{-D-glucoza} \xrightarrow{\text{mutarotaza}} \beta\text{-D-glucoza}$$

$$\beta\text{-D-glucoza} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Gox}} \text{acid gluconic} + H_2O_2$$

Determinarea polizaharidelor prin intermediul electrozilor enzimatici ridică o serie de probleme legate de optimizarea condiţiilor de lucru.

Etanolul sau metanolul, pot fi determinaţi utilizând două tipuri de enzime: alcooldehidrogenazele şi alcooloxidazele. Alcooloxidazele prezintă avantajul că pot fi regenerate în prezenţa O_2, dar necesită o furnizare constantă de oxigen pentru a asigura un răspuns corect.

În contrast, alcooldehidrogenazele necesită drept cofactor NAD^+ a cărei formă redusă (NADH) nu poate fi oxidată de către oxigen. Regenerarea NAD^+ se face de obicei utilizând un electrod de Pt căruia i se aplică un potenţial de + 0,75 V vs. SCE, intensitatea curentului obţinut fiind proporţional cu concentraţia de alcool.

În literatură sunt descrişi un număr mare de electrozi enzimatici amperometrici dintre care în tabelul 5.10 sunt redaţi o parte dintre aceştia precum şi unele dintre cele mai importante caracteristici.

Tab. 5.10. Sensori enzimatici amperometrici [25]

Analit	Enzima	Tehnica de imobilizare	Traductor	Timp de răspuns	Domeniu de linearitate
Glucoză	Glucozoxidază	E + poliacrilamidă	pO_2	30s – 3min	0-0.5g/l
Glucoză	Glucozoxidază	E + BSA +GA	pO_2	1-3 min	$0\text{-}2x10^{-2}M$
Glucoză	Glucozoxidază	E / nylon	pO_2	26-38s	1-20mg/dl
Glucoză	Glucozoxidază	E + poliacrilamidă	pO_2	1-2min	0-200mg/l
Glucoză	Glucozoxidază	E + gelatină +GA	pO_2	2-3min	0-2g/l
Glucoză	Glucozoxidază	E + poliacrilamidă	Pt	1min	$0\text{-}1.5x10^{-2}M$
Glucoză	Glucozoxidază	E / colagen	Pt	2-3min	$10^{-7}\text{-}2x10^{-3}M$
Glucoză	Glucozoxidază	E + BSA +GA	Pt	10s	$10^{-7}\text{-}2x10^{-3}M$
Glucoză	Glucozoxidază	E + acrilamidă	Pt	1-10min	$0\text{-}0.25x10^{-2}M$
Glucoză	Glucozoxidază	E + BSA +GA	Pt	1-2min	$0\text{-}0.27x10^{-2}M$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tab.5.10. Continuare

Glucoză	Glucozoxidază	E/membrană Semipermeabilă	Pt	6min	10^{-5}-7x10^{-3}M
Glucoză	Glucozoxidază	E/celofan	Pt	3-4min	10^{-4}-6x10^{-3}M
Glucoză	Glucozoxidază	E+cărbune modificat cu ferocen	grafit	1-1.5min	10^{-2}-3x10^{-2}M
Glucoză	Glucozoxidază	E/$NMP^{+}TCNQ$	Pt	-	0-0.26x10^{-2}M
Glucoză	Glucoz-dehidrogenază	E + BSA +GA	pO_2	3-15min	10^{-3}-8x10^{-4}M
Sucroză	Invertază Mutarotază Glucozoxidază	E + colagen +GA	pO_2	2-6min	0-10^{-3}M
Maltoză	Glucoamilază	E + colagen	Pt	6-7min	10^{-7}-3x10^{-4}M

Cercetările recente din domeniul biosensorilor vizează îmbunătățirea caracteristicilor de răspuns, fapt care se poate realiza prin utilizarea mediatorilor redox cum ar fi ferocenul, ftalocianinele, sărurile organice conductoare N-metilfenazina (NMP^{+}) şi tetracianochinodimetan ($TCNQ^{-}$). Mediatorii sunt compuşi chimici care pot media transferul de electroni între enzimă şi suprafaţa electrodului şi care au rolul de a micşora potenţialul aplicat sensorului amperometric de bază. O altă direcţie de cercetare în sensul menţionat o reprezintă studiile privind posibilitatea realizării unui schimb direct de electroni între elctrod şi centrul activ al enzimei. Aceste aspecte nu sunt tratate în acest capitol

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

6. APLICAȚIILE REACȚIILOR IMUNOCHIMICE ÎN CHIMIA ANALITICĂ

6.1. INTRODUCERE

Imunodeterminările reprezintă tehnici analitice care se bazează pe interacția specifică dintre antigen (Ag) și anticorp (Ac). Din punct de vedere analitic anticorpii sunt molecule de biorecunoaștere specifică. În principiu, anticorpii, ca reactivi analitici, pot să reacționeze cu orice structură chimică; anticorpii se obțin prin tehnica simplă a imunizării animalelor, ori prin tehnicile moderne de recombinare. În scopuri analitice, anticorpii au fost folosiți pentru prima dată în anii '50 de către Berson și Yalow [31] (laureați ai Premiului Nobel), care au pus la punct o metodă imunochimică de determinare cantitativă a insulinei umane în concentrații mici (picograme) din probe biologice. În următorii ani, aplicațiile tehnicilor imunoanalitice în domeniile biochimiei, chimiei clinice și al monitorizării mediului au crescut exponențial. În anul 1980 Hammock și Mumma [32] au demonstrat posibilitatea utilizării acestor metode pentru determinarea pesticidelor, metodele imunochimice de anliză fiind astfel acceptate de către chimiștii care lucrează în domeniul cotrolului poluării mediului. În prezent este evident impactul acestor metode asupra domeniului protecției mediului înconjurător, în literatura de specialitate existând numeroase metode de determinare a diverșilor poluanți (contaminanți) incluzând pesticidele, rezidurile industriale și produșii lor de degradare. Intensificarea cercetărilor din domeniul metodelor imunochimice de analiză se datorează în principal avantajelor de care beneficiază aceste tehnici dintre care se menționează: specificitatea, simplitatea, sensibilitatea mare precum și prețul de cost scăzut. În plus, orice compus chimic este capabil să inducă un răspuns imun.

Odată cu dezvoltarea tehnicilor de obținere a anticorpilor monoclonali și policlonali tehnicile imunochimice s-au dezvoltat foarte mult. În prezent anticorpii policlonali produși în urma imunizării animalelor sunt înlocuiți cu anticorpii monoclonali care reprezintă amestecuri omogene de anticorpii care pot fi preparați cu ușurință în cantități mari în culturile de celule. Recent anticorpii recombinați obținuți prin metode ale ingineriei moleculare sunt din ce în ce mai folosiți în imunoanaliză, astfel incât se pare că în perspectivă nu vor mai fi necesare animalele de experiență pentru obținerea anticorpilor.

Dezvoltarea imunoanalizelor din ultimii 40 de ani au revoluționat metodologia de detecție a medicamentelor și a hormonilor în analizele clinice clasice precum și a poluanților din mediul inconjurător. Aceste metode clasice bazate pe interacții de afinitate necesită o serie de "marker"-i enzimatici, fluorescenți sau radioactivi. Metodele imunochimice de analiză și-au găsit aplicații numeroase în domeniile chimiei clinice, alimentare, în controlul apei potabile, a apei de suprafață și în monitorizarea solului.

Există foarte multe moduri de a realiza metodele de imunoanaliză (heterogene și omogene), dar cele mai utilizate sunt tehnicile analizei imunosorbante cu enzima legată (ELISA) care poate fi competitivă (directă sau indirectă), sau de tip "sandwich". ELISA, combină selectivitatea anticorpilor cu sensibilitatea mare dată de amplificarea enzimatică, caracteristici ce conduc la obținerea unor limite de detecție în domeniul fentomolar. Tehnica ELISA este realizată pe micro-plăci ea având la bază o serie de etape de incubare și spălare, ceea ce determină ca această tehnică să fie complicată și laborioasă. Această metodă este una de echilibru în formarea complexului Ac-Ag, lucru care de obicei durează o oră sau mai mult. Determinările în mediu omogen se bazează pe modificarea semnalului generat de "marker", ca urmare a formării unui imuno-complex în soluție. În mod

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

asemănător, sistemele pseudo-omogene nu necesită etape de separare, dar imunoreacţia principală are loc la suprafaţa electrodului.

În ultimii ani, au apărut o serie de noi metode imunochimice având la bază imunosensorii; aceştia au apărut ca urmare a necesităţii scurtării timpului de analiză, ei putând fi folosiţi şi în analiza "*in situ*". Utilizarea anticorpilor pentru construcţia biosensorilor imunochimici (imunosensorilor) se realizează cu succes de peste 20 de ani. Imunosensorul reprezintă un instrument analitic care detectrează în mod selectiv compusul de interes, el generând un semnal dependent de concentraţia acelui compus. Imunosensorii electrochimici au la bază drept elemente de bio-recunoaştere fie Ac fie Ag sau haptene care sunt fixate pe suprafaţa traductorilor electrochimici. Anticorpii asigură specificitatea metodei în timp ce traductorii electrochimici sunt responsabili pentru sensibilitatea acestora, în final obţinându-se un instrument analitic la un preţ de cost scăzut.

Recent IUPAC [33] a propus o definiţie pentru biosensorii electrochimici (vezi capitolul 5). Conform acestei definiţii un imunosensor reprezintă un instrument integrat, de sine stătător, care constă dintr-un component imunochimic de recunoaştere aflat în contact direct cu un traductor, făcându-se astfel o diferenţiere netă de un sistem imunochimic sau de o imunoprobă. Sistemul imunochimic necesită în plus o serie de alte operaţii cum ar fi etapele de adăugare de reactivi, separare, spălare, iar imunoproba se realizează într-o singură etapă, fiind de unică folosinţă, şi deci nu poate fi utilizată în monitorizarea continuă a concentraţiei de analit.

În funcţie de modalitatea de preluare a semnalului, există două categorii de imunosensori: direcţi şi indirecţi. Imunosensorul direct (nemarcat) este acela care determină în mod direct interacţia dintre anticorp şi antigen, într-un mod continuu şi într-un timp real. Imunosensorii nemarcaţi sunt bazaţi pe măsurarea modificărilor unor proprietăţi fizice ca permeabilitatea ionică, conductivitatea, constanta dielectrică, mobilitatea ionică, masa, vâscozitatea, indicele de refracţie, sau a grosimii stratului sensibil, din momentul formării complexului Ac-Ag. Sensibilitatea obţinută depinde de tipul de traductor folosit şi de afinitatea moleculelor biosensibile. Pentru detecţia directă au fost folosiţi traductorii electrochimici, piezoelectrici, optici.

Pe de altă parte, imunosensorul indirect (marcat) măsoară rezultatul evenimentului de cuplare cum ar fi de exemplu creşterea sau scăderea cantităţii de "marker" legat (enzima, mediator redox, ş.a.), astfel încât acest tip de imunosensor determină "marker"-ul şi deci, indirect, imunoreacţia. În cazul imunosensorilor marcaţi generarea semnalului este uşurată semnificativ, datorită proprietăţilor "marker"-ilor de fluorescenţă, radioactivi, enzimatici folosiţi, dar apar o serie de probleme legate de sinteza, stabilitatea şi preţul de cost al "marker"-ilor folosiţi, precum şi de imposibilitatea realizării determinărilor într-un timp real.

6.2. ANTICORPI - ASPECTE GENERALE

6.2.1. STRUCTURA ŞI ROLUL ANTICORPILOR

Prin expunerea unui individ, spre exemplu, la un agent infecţios, se activează răspunsul imun şi limfocitele B încep să producă proteine receptor specifice, numite anticorpi. Anticorpii sunt glicoproteine care aparţin familiei imunoglobuluinelor (Ig). Există cinci tipuri mai importante de anticorpi (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) care diferă prin poziţii ale anumitor grupări, sarcină electrică, compoziţie în aminoacizi şi conţinutul în carbohidraţi. Tipul IgG reprezintă grupul de anticorpi cel mai abundent şi deasemenea cel

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

mai des folosit ca reactiv imunochimic. Toate moleculele IgG au aceeaşi structură de bază şi o masă moleculară aproximativă de 150 kDa.

Anticorpii se produc în serul şi fluidele celulare ale tuturor mamiferelor. Un anticorp constă în două lanţuri grele şi două lanţuri uşoare unite între ele prin punţi disulfurice. Fiecare din lanţurile grele posedă trei domenii constante şi un domeniu variabil, iar fiecare din lanţurile uşoare posedă un domeniu constant şi un domeniu variabil. Domeniile variabile sunt responsabile de specificitatea anticorpilor şi conţin situsurile de legare pentru antigen. Structura anticorpului este descrisă de forma literei Y, cu două situsuri de legare a antigenului denumite fragmentele Fab şi un fragment Fc care leagă receptorii celulelor specializate din organism. Astfel, fragmentul Fc nu prezintă o importanţă reală când se lucrează cu anticorpii ca elemente de recunoaştere folosite în construcţia imunosensorilor, dar acest fragment are o mare importanţă în imobilizarea direcţionată prin anumite grupări ale fragmentului Fc. Cel mai răspândit anticorp, IgG, are o masă moleculară de aprox. 150 kDa. Reprezentarea schematică a structurii unui Ac este redată în figura 6.1.Structura moleculei de imunoglobulină s-a stabilit prin analiza proteinelor omogene secretate de plasmocitoame, utilizându-se metode, cristalografice prin difracţie cu raze X.

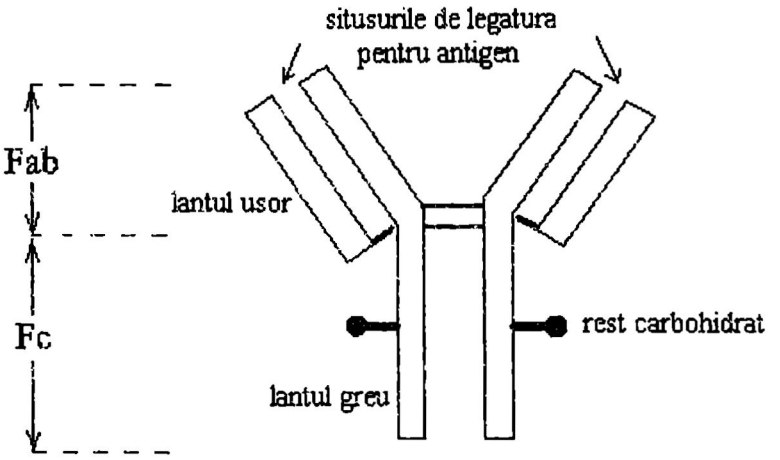


Fig. 6.1. Structura unui anticorp de tipul IgG

Este posibil ca fragmentul Fc al anticorpului să conducă la formarea unor legături nespecifice. Înainte de imobilizare pentru îndepărtarea acestui fragment, molecula de anticorp poate fi tratată cu pepsină ori papaină. Atacul proteolitic al papainei va produce două fragmente separate de legare a antigenului, Fab, în timp ce atacul pepsinei va produce un singur fragment cu două situsuri de legare a antigenului $F(ab')_2$ (figura 6.2). Fragmentele Fab au forme elipsoidale cu axele mare şi mică de 6 şi respectiv 4 nm. Numărul posibil de molecule de anticorpi a fost estimat la mai mult de 10^{10}, iar diversitatea anticorpilor este guvernată de regiunile hipervariabile ale situsurilor de legare a antigenului (fragmentul Fab). Datorită flexibilităţii regiunii "balama", doi antigeni pot lega anticorpul în acelaşi timp sau se poate cupla un antigen multivalent. Fragmentul Fc al anticorpului poate interacţiona cu celulele fagocite mononucleare care prezintă la suprafaţa membranei receptori pentru acesta. În momentul în care anticorpul se leagă de receptorul său specific de pe fagocit, are loc stimularea diverselor funcţii ale celulei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

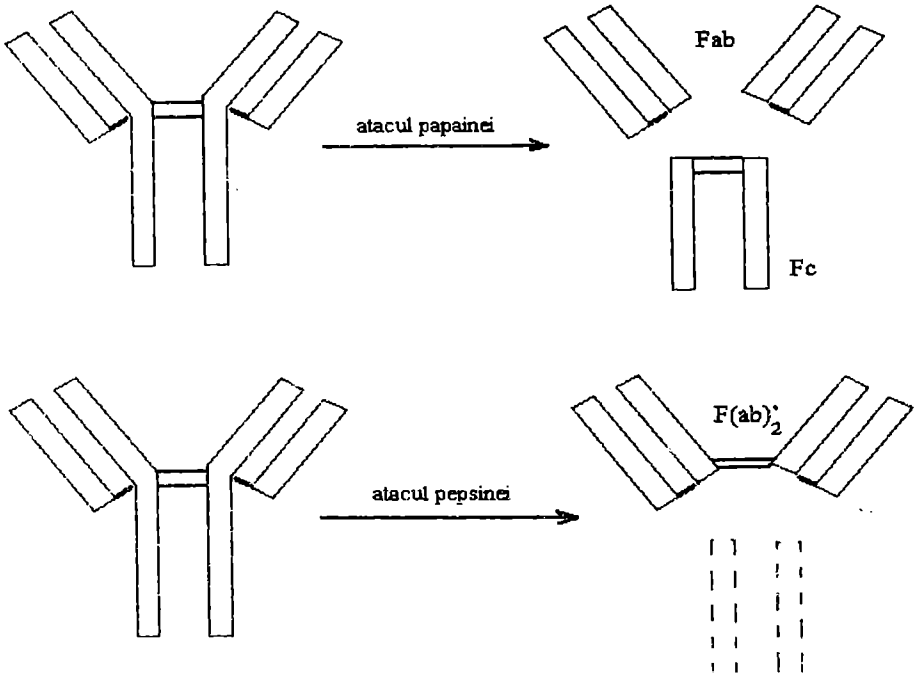


Fig. 6.2. Schema de fragmentare a IgG. Partea de sus ne arată fragmentarea folosind papaina iar cea de jos folosind pepsina.

6.2.2. PRODUCEREA DE ANTICORPI

6.2.2.1. ANTICORPI POLICLONALI

Anticorpii policlonali sunt produşi printr-o tehnică de imunizare a unui animal (iepure, oaie) prin injectare directă de antigen ţintă (imunogen). De obicei un răspuns imun nu poate fi indus de molecule mai mici de 2.000 Da, adică de haptene. Pentru a se obţine totuşi anticorpi şi împotriva acestor molecule mici (haptene) acestea trebuie cuplate de proteine purtătoare (de exemplu albumina serică bovină - BSA, hemocianină, sau ovalbumină). Legarea de aceste proteine se realizează înaintea procesului de imunizare. Apoi se recoltează sânge de la animalul respectiv, iar antiserul rezultat este supus purificării. Rezultatul procedeului de imunizare este un amestec ce conţine câteva sute de anticorpi diferiţi (anticorpi policlonali), ce pot interacţiona cu diverşi epitopi ai antigenilor cu diferite afinităţi. Dacă molecula imunogenă este o haptenă cuplată cu o proteină purtătoare, numai o fracţiune de 10-15% din anticorpii produşi vor acţiona specific împotriva antigenului ţintă.

6.2.2.2. ANTICORPI MONOCLONALI

Pentru a se putea produce anticorpi monoclonali, animalul, de obicei şoarece sau şobolan, va fi imunizat în acelaşi mod ca şi pentru producerea de anticorpi policlonali, apoi se extrage splina animalului. Limfocitele B din splină vor fuziona cu o linie de celule mielomice, din acest proces de fuziune rezultând celule hibridom. Aceste celule hibridom sunt testate pentru a se determina care dintre ele vor produce anticorpul dorit. Celulele cu

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

reacţie pozitivă sunt clonate şi testate iaraşi pentru a se obţine hibridoame de un singur tip. Aceste celule sunt crescute şi menţinute în viaţă în nişte recipiente de sticlă ce conţin mediu de cultură, ele secretând anticorpii monoclonali. Anticorpii monoclonali sunt identici între ei şi au aceeaşi capacitate de legare pentru aceluiaşi epitop al unui antigen.

6.2.3. REACTIVITATEA ÎNCRUCIŞATĂ (NESPECIFICĂ) ŞI MODUL DE LUCRU CU HAPTENA (ANTIGENUL INCOMPLET)

Reactivitatea incrucişată a anticorpilor se referă la specificitatea anticorpului faţă de alţi compuşi decât cel ce reprezintă antigenul ţintă. Reactivitatea încrucişată pentru anticorpii policlonali este în general mai mare decât a anticorpilor monoclonali, dar în ambele cazuri gradul reactivităţii încrucişate este dependent de structura imunogenului şi de procedeul de imunizare.

Haptena (moleculă de dimensiune mică) reprezintă un antigen incomplet în sensul că introdusă în organism nu va determina apariţia unui răspuns imun umoral (secreţie de anticorpi), dar cuplată cu o macromoleculă purtătoare va stimula secreţia de anticorpi cu care va interacţiona ca un antigen normal.

Optimizarea folosirii haptenei se va face astfel încât macromolecula purtătoare să fie cuplată la o "distanţă" cât mai mare posibil de situsul de recunoaştere, această haptenă devenind astfel o adevarată moleculă ţintă. Pentru controlul calităţii mediului, când analiţii sunt reprezentaţi de molecule de dimensiuni mici, iar structural pot fi asemănătoare, reactivitatea încrucişată este teoretic mult mai mare decât cea implicată în analizele biologice ale macromoleculelor.

6.2.4. ANTICORPII – ELEMENTE DE RECUNOAŞTERE MOLECULARĂ

Performanţa imunosensorilor depinde de selectivitatea şi de afinitatea anticorpilor imobilizaţi. Dezvoltarea tehnologiei de fuziune, pentru producerea de anticorpi monoclonali, a deschis oportunităţi puternice în domeniul imunosensorilor şi producerii pe scara largă a anticorpilor monoclonali cu sensibilitate şi selectivitate dorite. Urmatoarea etapă este de a aplica tehnicile de producere a anticorpilor recombinaţi şi de a crea o bancă de anticorpi recombinaţi care va conţine o gamă largă de tipuri de anticorpi.

6.3. IMOBILIZAREA ANTICORPILOR

În această paragraf se vor trata pe scurt metodele de imobilizare covalentă a Ac, deoarece acestea sunt cel mai des folosite în proiectarea biosensorilor.

6.3.1. IMOBILIZAREA NEDIRECŢIONATĂ REALIZATĂ PRIN GRUPELE ε-AMINO ALE ANTICORPILOR

Anticorpii sunt de obicei imobilizaţi prin intermediul grupelor ε-amino datorită faptului că Ac conţin în jur de 60-80 resturi de lisină. O metodă generală se bazează pe activarea unui suport hidroxilat cu brom-cian; această metodă are o serie de dezavantaje descrise în literatură [28].

Una dintre cele mai folosite metode pentru imobilizarea proteinelor este bazată pe folosirea glutaralaldehidie care poate reacţiona cu diverse suporturi conţinând gruparea amino. Deoarece glutaraldehida este un reactiv de cuplare bifuncţional, poate avea loc

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

deasemenea şi legarea încrucişată între proteine. Principalul dezavantaj al cuplării prin intermediul glutaraldehidei este reproductibilitatea mică a procedeului.

O altă modalitate este aceea de crea grupări aldehidice active pe un suprafaţa unui suport, care formează baze Schiff stabile cu grupele amino primare ale proteinei. Randamentul de cuplare este de 80-90% în acest caz. Prin această metodă raportul de combinare Ac:Ag nu a fost mai mare de 1:1, chiar şi atunci când anticorpul a prezentat două situsuri de legare pentru antigen. Acest lucru indică faptul că jumatate din numărul situsurilor de legare pentru antigen ale anticorpilor ar putea fi inaccesibile interacţiei cu acesta.

În acelaşi scop s-a utilizat şi carbodiimidă. Prin utilizarea acesteia, suportul carboxilat reacţionează cu carbodiimida pentru a forma un intermediar ce va reacţiona cu aminele primare formându-se legături amidice. Legăturile covalente astfel formate sunt foarte stabile. Imunoglobulina G a fost astfel imobilizată pe monostraturi carboxilate.

Toate metodele descrise mai sus se bazează pe cuplarea la grupele ε-amino ale Ac. Totuşi, aceste grupe sunt distribuite intâmplător pe suprafaţa anticorpului, conducând la multiple orientări ale anticorpilor pe suprafaţa de imobilizare. Pentru a se evita acest lucru, se poate folosi o metodă de cuplare directă la situsul dorit, aspect discutat în continuare.

6.3.2. IMOBILIZAREA DIRECŢIONATĂ PRIN INTERMEDIUL UNOR GRUPE SPECIFICE ALE Ac

Prin aceste metode situsurile active ale elementelor de recunoaştere sunt orientate spre soluţie, obţinându-se o activitate mai mare . O'Shannessey şi Wilchek[34] au arătat că Ac imobilizaţi prin fragmentul Fc au o capacitate de legare a Ag de două ori mare comparativ cu Ac imobilizaţi întâmplătoar. Imobilizarea direcţionată printr-o anumită grupare se realizează de obicei prin intermediul unui număr redus de grupele funcţionale de pe suprafaţa anticorpului şi a căror poziţie în cadrul structurii proteice este cunoscută. În plus aceste grupe trebuie să fie poziţionate la o anumită distanţă de centrul activ pentru a nu-l bloca.

Există trei metode de imobilizare directă la situsul dorit. Prima metodă foloseşte cuplarea prin restul carbohidrat al fragmentului Fc al anticorpului. Cea de a doua metodă are la bază cuplarea prin intermediul punţilor disulfurice, menţinându-se cele două lanţuri grele impreună; cea de a treia metodă foloseşte imobilizarea iniţială a proteinei A sau a proteinei G pe suprafaţa traductorului, deoarece este cunoscut că anticorpii se leagă de aceste proteine prin intermediul fragmentului Fc. Din date xperimentale a rezultat că moleculele de anticorpi denaturate parţial sunt mai bine orientate pe suprafaţă comparativ cu Ac naturali, expunând situsurile de legare pentru antigen la exterior în soluţie, mărindu-se astfel activitatea de legătură a antigenului.

Imobilizarea anticorpilor prin restul carbohidrat

Anticorpi pot fi imobilizaţi pe suporturi activate cu hidrazidă dacă catenele carbohidrate ale anticorpilor sunti oxidate la grupele aldehidice cu periodat de sodiu. Eficienţa cuplării depinde de cantitatea de proteină şi de accesibilitatea catenelor laterale de carbohidraţi.. În cazul imunoglobulinelor randamentul cuplării a fost de 74% şi raportul anticorp-antigen legat este 1:2. Această metodă conduce la obţinerea unor suprafaţe având toate situsurile de legătură pentru antigene accesibile cuplării.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Imobilizarea prin resturile reduse sulfhidril

Anticorpii sau fragmentele de anticorp $F(ab')_2$ pot fi reduse prin tratarea cu 2-mercaptoetilamină. Aceasta este o metodă de reducere preferențială a punților sulfurice din regiunea "balama" menținându-se împreună lanțurile grele ale anticorpului. Drept rezultat molecula de anticorp este scindată în două fragmente cu grupe sulfhidril libere, ce pot fi folosite pentru imobilizarea directă pe un suport activat cu iodacetil sau bromacetil. Se formează o legătură tioeterică foarte stabilăt între anticorp și suport. În plus, cinetica cuplării este foarte rapidă (15 min). De cele mai multe ori este mai avantajos să se folosească fragmentul $F(ab')_2$ redus decât reducerea întregului anticorp, deoarece fragmentul Fc al întregului anticorp poate da naștere la legături nespecifice. Fragmentele Fab au fost imobilizate ele cgenerând suprafețe cu capacitate mare de cuplare, adsorbția nespecifică fiind mică în acest caz, preparatele obținute având o stabilitate mare. O altă posibilitate este autoasambiarea anticorpilor reduși sau a fragmentelor de anticorp direct pe suprafețe de aur.

6.4. INTERACȚIUNEA SPECIFICĂ FAȚĂ DE CEA NESPECIFICĂ

O problemă asociată cu imunosensorii nemarcați este legarea nespecifică dintre antigen și anticorp, deoarece nu există posibilitatea discriminarii exacte între semnalele măsurate pentru interacțiile specifice și cele nespecifice. Pentru a se putea realiza o a stfel de diferențiere, traductorul ar trebui să fie sensibil la modificările conformaționale ale situsului de legare a antigenului sau la modificările de distribuție a sarcinilor în jurul acestui situs în momentul legării antigenului. Lee și colab.[35] au construit un astfel de imunosensor, prin cuplarea fluoresceinei de proteina A. La adăugarea IgG care se leagă de proteina A, câmpul electric local s-a modificat, și ca urmare s-a modificat concentrația locală a grupărilor OH^-. Deoarece intensitatea fluoresceinei este depentă de pH, această interacțiune (proteina A cu IgG) poate fi măsurată.

Pentru a se obține un imunosensor cu caracteristici controlabile suprafața acestuia trebuie proiectată într-un mod care să se asigure o cuplare specifică superioară celei nespecifice. Factorii care influiențează adsorbția antigenilor de proveniență proteică sunt: caracteristicile suprafeței, proteina și condițiile din soluție. Este bine cunoscut faptul că adsorbția este mai mare în cazul suprafețelor hidrofobe decât în cazul celor hidrofile. Mai mult s-a demonstrat că, de obicei, adsorbția maximă are loc in jurul valorii punctului izoelectric al proteinei adsorbite. O explicație posibilă pentru aceasta este apariția unei repulsii minime între moleculele adsorbite. Pentru a proiecta o suprafața cu o adsorbție nespecifică redusă ar trebui să se obțină o energie liberă interfacială minimă între acea suprafața și soluție. Acest lucru este posibil dacă se folosesc, spre exemplu, hidrogelurile sau polimeri hidrofili cum ar fi oxizii polietilenici.

6.5. REGENERAREA IMUNOSENSORILOR

Regenerarea suprafeței imunosensorilor este una dintre problemele des intâlnite în studiul acestora. În organism anticorpii sunt utilizați de către sistemul imun pentru a se ataşa de moleculele străine în vederea eliminării lor de către anumite celule. În acest mod în natură se asigură ireversibilitatea interacțiilor anticorp/antigen. Pentru realizarea unor imunosensori foarte sensibili ar trebui folosiți anticorpii cu afinitate mare. În acest caz cuplarea dintre anticorp și antigen devine aproape ireversibilă, ceea ce se poate explica prin faptul că, constanta de afinitate este controlată de viteza de disociere și mai puțin de viteza

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de asociere. Astfel apare o contradicţie între reversibilitatea rapidă şi sensibilitatea mare, care reprezintă proprietăţi dorite în cadrul aplicaţiilor practice ale biosensorilor. În acest sens se pot folosi anticorpi cu o afinitate mică dar în aceste condiţii imunosensorul nu mai este sensibil. Deasemenea, s-a demonstrat faptul că dacă în soluţie complexul liber poate disocia, acest lucru nu este întotdeauna valabil în condiţiile în care anticorpii sunt imobilizaţi pe un suport solid. Cinetica disocierii de pe un suport solid este câteodată mult mai lentă. O posibilă explicaţie se bazează pe faptul că stratul de separare dintre suprafaţă şi soluţie conţine o concentraţie foarte mare de anticorpi fapt care împiedică deplasarea antigenului în acest mediu pentru a difuza înspre masa soluţiei. De aceea sunt necesare condiţii extreme de eluţie cum ar fi un pH foarte mare sau foarte mic, concentraţii mari de săruri sau anumiţi agenţi de denaturare. Eluţia realizată şn astfel de condiţii extreme conduce de obicei la o denaturare parţială a anticorpilor imobilizaţi. În literatură se specifică faptul că chir în condiţiile utilizării unei soluţii de uree 8 M ca agent de disociere imunoreactivitatea anticorpilor scade foarte puţin, aceţtia putând fi folosiţi în cadrul a 4o de determinări. O soluţie pentru evitarea problemei regenerării este aceea de a realiza imunosensori de unică folosinţă, care ar presupune însă ca reproductibilitatea obţinerii acestora să fie foarte bună deoarece aceşti sensori nu pot fi calibraţi. O altă soluţie ar fi legată de posibilitatea îndepărtării complexului anticorp:antigen după fiecare măsurătoare. Acest lucru se poate realiza prin folosirea unei suprafaţe pe care să fie imobilizată proteina A sau G deoarece fragmentul Fc al anticorpilor se leagă de una din aceste proteine.

6.6. ASPECTE TEORETICE ALE IMUNOANALIZEI

Interacţia dintre anticorp şi antigen este asemănătoare celei dintre enzimă şi substratul său. Centrul de legare pentru antigen al anticorpului este similar centrului activ al enzimei. Prin studii cristalografice cu raze X, s-a stabilit faptul că 15 până la 22 resturi de aminoacizi aparţinând centrului de legare ai Ag sunt implicaţi în legarea acestuia de Ac. Dintre aceşti 3 până la6 resturi de aminoacizi contribuie la energia liberă a legăturii. Interacţia, ca şi în cazul celei dintre enzimă şi substrat este, de natură biospecifică conformaţia tridimensională a acestora având o contribuţie decisivă. Interacţia Ag-Ac are la bază legături slabe necovalente cum ar fi cele electrostatice, legături de hidrogen sau prin forţe van der Walls.

Prin definiţie, o imunoanaliză reprezintă un instrument analitic care se bazează pe distribuţia antigenului liber (analitului) în raport cu antigenul legat de anticorpul corespunzator. Astfel se pot obţine informaţii cantitative. Cel mai folosit model teoretic pentru descrierea legării reversibile a antigenului de anticorp este modelul Scatchard:

$$Ag + Ac \xleftrightarrow{k_{+1}} AgAc$$

$$K_{af} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[AgAc]}{[Ag][Ac]} \qquad (6.1)$$

(6.2)

k_{+1} reprezintă constanta vitezei de formare, k_{-1} reprezintă constanta vitezei de disociere iar K_{af} constanta de afinitate care descrie tăria cu care anticorpul leagă antigenul corespunzator şi se situează în domeniul 10^6-10^{12} M^{-1}. Performanţele metodelor imunochimice sunt legate de valoarea constantei K_{af} în sensul că pentru valori mari ale acesteia se obţin limite de detecţie scăzute.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Concentraţia totală de anticorp [Ac_{tot}] este descrisă de ecuaţia 6.3:

$$[Ac_{tot}] = [Ac] + [AgAc] \qquad (6.3)$$

Prin înlocuirea concentraţiei anticorpului liber cu concentraţia anticorpului total minus anticorpul legat, rezultă urmatoarea ecuaţie:

$$K_{af} = \frac{[AgAc]}{([Ac_{tot}] - [AgAc])[Ag]} \qquad (6.4)$$

prin rearanjare rezultă:

$$\frac{[AgAc]}{[Ag]} = K_{af}[Ac_{tot}] - K_{af}[AgAc] \qquad (6.5)$$

Fracţiunea legată [AgAc] este notată în general cu (B) iar fracţia liberă este notată cu [Ag]. Reprezentarea grafică a raportului B/F (legat/liber) în funcţie de B este redat în figura 6.3.

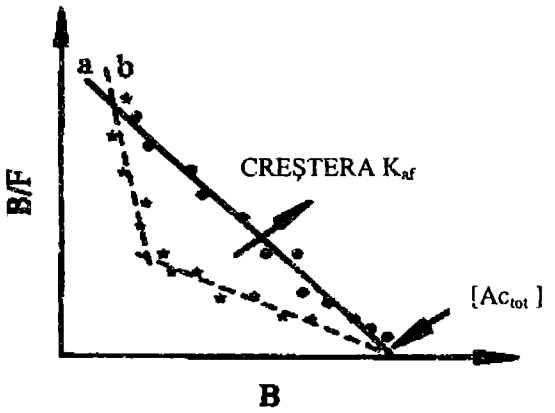


Fig. 6.3. Graficul Scatchard pentru (a)-anticorpi monoclonali;
(b)-anticorpi policlonali.

În condiţiile utilizări anticorpilor monoclonali, din graficul Scatchard este posibilă determinarea constantei K_{af} precum şi a concentraţiei totale de anticorp care se obţine din intersecţia cu abscisa. În cazul anticorpilor policlonali, este dificilă estimarea valoarii K_{af} datorită amestecului de tipuri de anticorpi cu diferite constante de afinitate.

În funcţie de curba Scatchard obţinută este posibilă uneori împărţirea populaţiei de anticorpi în două, aşa cum rezultă şi din figura 6.3.b. Partea superioară a curbei reprezintă anticorpii cu afinitate mare, iar partea de jos a curbei reprezintă anticorpii cu afinitate mică. Prin trasarea graficului B funcţie de lgF (a se vedea figura 6.4.) se poate estima valoarea medie sau aparentă pentru K_{af} pentru o populaţie de anticorpi policlonali. În cazul unei analize competitive aceasta corespunde unei curbe de calibrare relativă la Ag obţinută în condiţiile unei legări libere de 50% a anticorpilor(IC_{50}).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

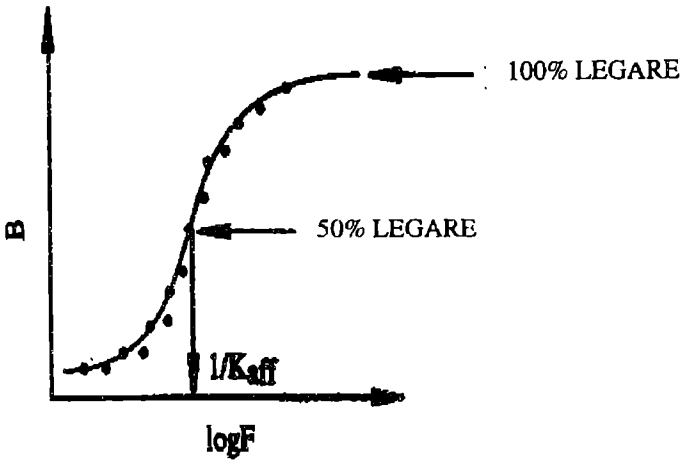


Fig.6.4. Curba de saturare a anticorpului

6.7. PRINCIPIILE IMUNOANALIZEI

Clasificarea principalelor metode imunoanalitice este redată figura 6.5.

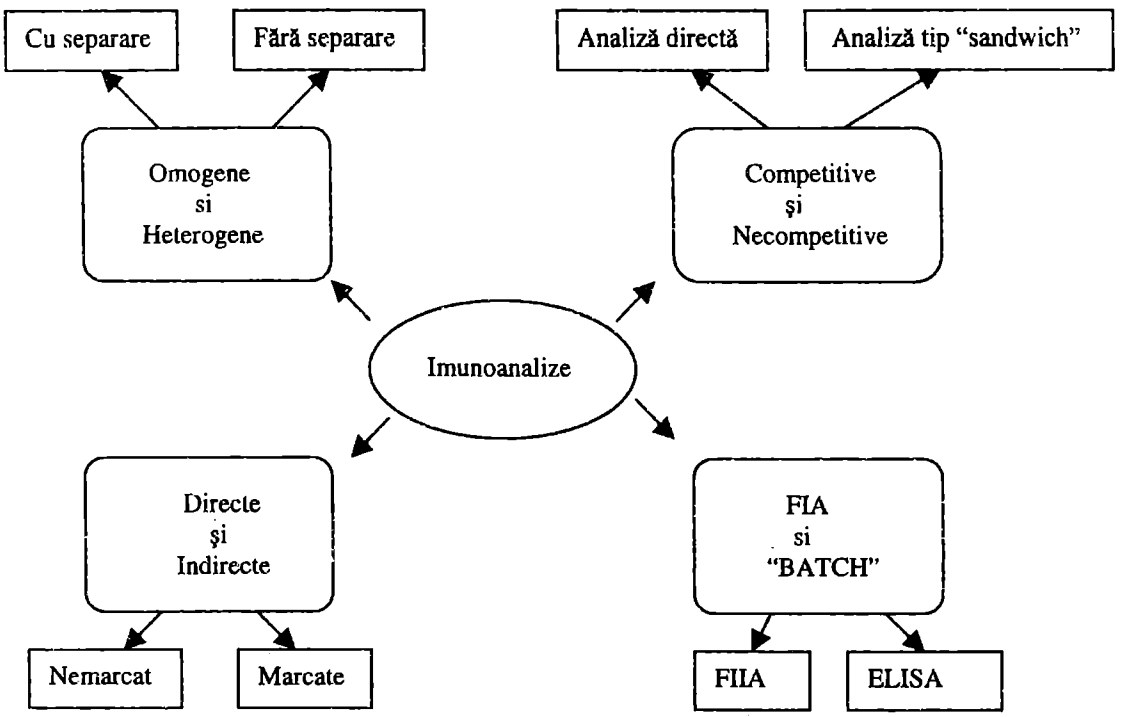


Fig. 6.5. Clasificarea imunoanalizelor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Imunodeterminările pot fi împărţite în determinări directe şi indirecte. Determinările directe nu necesită folosirea unor markeri în scopul cuantificării relaţiei dintre antigenul legat şi cel liber. O metodă directă bine cunoscută este RPS (rezonanţa plasmonică de suprafaţă). Totuşi, în majoritatea imunodeterminărilor este necesară utilizarea markerilor (ex. imunoanaliza indirecta), în special în cazul realizării unor determinări foarte sensibile. Markerul este legat fie de antigen fie de anticorp. Enzimele, radioizotopii sau moleculele care generează fenomele de fluorescenţă, sau de chemiluminiscenţă sunt exemple de markerii folosiţi în imunoanalize.

Imunodeterminările pot fi de asemenea clasificate după principiul competitiv sau necompetitiv al acestora. Imunodeterminarea omogenă nu necesită etape de separare a moleculelor marcate (Ag^* sau Ac^*) de cele nemarcate (Ag sau Ac), astfel încât reacţia imunochimică dintre moleculele marcate şi cele nemarcate dă naştere direct la o modificare de semnal măsurabilă. S-au realizat de asemenea, diverse tipuri de analize omogene bazate pe markerii enzimatici. În general metodele heterogene conduc la o mărire a sensibilităţii atâta timp cât efectele de matrice nu vor influenţa tot atât de mult performanţele analizei. Metodele imunoanalitice pot fi deasemenea clsificate în competitive (metoda reactivului limitat) şi necompetitive (metoda reactivului în exces), care la rândul lor pot fi împărţite în sub-clase.

6.7.1. IMUNOANALIZA COMPETITIVĂ

Imunodeterminările competitive pot fi realizate în moduri diferite, cele mai utilizate fiind tipurile directe şi indirecte şi înlocuirii. Molecule mici de antigen sunt de obicei determinate prin metode competitive, de exemplu modalitatea directă a fost utilizat pentru detecţia atrazinei, acidului 2,4-difenoxi acetic şi a paraquat-ului. Modalitatea indirectă a fost folosită, deasemenea, pentru analiza unor molecule mici, cum ar fi atrazina sau, clorpirifosul. Determinarea acidului 2,4-diclorofenoxi acetic s-a realizat pe baza utilizării principiul înlocuirii.

Sensibilitatea metodelor competitive directe este limitată de diverşi factori, cum ar fi: constanta de afinitate K_{af}, precizia determinărilor la concentraţii mici de compus de determinat precum şi de legarea nespecifică. Teoretic,cu cât concentraţia de analit-marker folosită este mai mică cu atât limita de detecţie scade şi cu atât mai puţin Ac este necesar în determinare. Pentru a se minimaliza eroarea estimarării centrelor de legare rămase neocupate este necesară folosirea unei concentraţii mici de anticorp. În principiu, acest lucru înseamnă că K_{af} limitează sensibilitatea determinărilor deoarece procentul de ocupare a centrelor de legare este determinat de afinitatea dintre anticorp şi antigen. Ssensibilitatea depinde totuşi de o precizie mare şi de o legarea nespecifică foarte mică.

6..7.2. IMUNOANALIZA NECOMPETITIVĂ

Metodele imunochimice având la bază iteracţii necompetitive pot implica un singur centru de legare al Ac sau doi centrii de legare ai Ac ("sandwich"). Determinarea prin tehnica "sandwich" se aplică numai în cazul antigenelor de dimensiuni moleculare mari, deoarece Ag necesită cel puţin doi epitopi pentru a fi capabil să lege doi anticorpi simultan. Acest tip de analiză prezintă o sensibilitate mare.

Imunodeterminările necompetitive sunt mai sensibilea decât cele competitive. Teoretic, se poate calcula valoarea limitei optime de detecţie în determinării competitive comparativ cu cea necompetitivă pentru o aceeaşi reacţie antigen-anticorp. Pentru o

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

valoare a constantei de afinitate de 10^{12} M^{-1} limita de detecţie pentru analizele competitive şi necompetitve a fost găsită a fi 10^{-14} M şi respectiv 10^{-16} M.

6.8. MARKERI FOLOSIŢI PENTRU OBŢINEREA INFORMAŢIEI ANALITICE ŞI BIOCHIMIA CONJUGĂRII

Unul dintre cei mai importanţi factori în dezvoltarea metodelor imunochimice îl reprezintă marcarea a antigenului sau a anticorpului, acesta având şi o contribuţie semnificativă şi la sensibilitatea metodelor. Markerii sunt folosiţi pentru a diferenţia şi cuantifica distribuţia antigenelor legate faţă de cele nelegate. Iniţial au fost utilizaţi markerii radioizotopici: ^{131}I , ^{125}I , ^{3}H, şi ^{14}C, la care se renunţă treptat datorită în special toxicităţii lor. Proprietăţile chimice ale markerilor sunt esenţiale în cadrul determinărilor imunochimice, fiind important ca aceştia să posede anumite proprietăţi cum ar fi: (i) să poată fi detectabili în concentraţii foarte mici pentru a asigura o sensibilitate de 10^{-15}-10^{-18} moli; (ii) capacitatea de legare a reactantului marcat trebuie să fie nealterată şi prin aceasta neinfluenţându-se interacţiile biochimice; (iii) interacţiile nespecifice ale markerului trebuie se fie cât mai mici posibil; (iv) reactantul marcat trebuie să fie cât mai stabil; şi (v) să prezinte o toxicitate scăzută. În tabelul 6.1.se prezintă o serie de markeri neizotopici folosiţi în imunoanalize.

Tab. 6.1. Markerii neizotopici folosiţi în imunoanaliză [28]

Markeri		Determinare
Enzimă	Catalază Glucoz oxidază Peroxidază Luciferază Urează	Amperometrică- determinarea O_2 Determinarea luminiscenţei Determinare potenţiometrică a fenolului
Catalizatori	Hemina	Determinarea luminiscenţei
Fluorofori	Fluoresceina ex.FITC (fluorescein izotiocianatul)	Determinarea fluorescenţei
Substaţe electroactive	Ferrocenii	Determinare amperometrică
Lipozomi	Marker ionic	Determinarea potenţiometrică a markerului ionic

Antigenul (sau anticorpul) trebuie marcat în aşa fel incât să nu prezinte un impediment steric pentru legarea anticorpului sau antigenului de compusul de dozat. În cazul unor analiţi de dimensiuni mici,între marker şi imunoreactant se intercaleaza un compus chimic care are rolul de menţine conformaţia sterică. Principalele aspecte care se au în vedere în condiţia conjugării imunoreactanţilor sunt urmatoarele: (i) grupele reactive ale markerului, (ii) reactivii folosiţi pentru cuplarea acestor grupe reactive (iii) cantitatea de marker folosită (iv) condiţiile experimentale (v) izolarea şi purificarea conjugatului. Exemple de grupe reactive aparţinând enzimelor şi anticorpilor şi care sunt folosite în mod curent pentru conjugare sunt: amino, tio, fenoxi, carboxi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

6.9. IMUNODETERMINĂRI ELECTROCHIMICE

Aceste metode sunt cele mai apropiate de sensul adevarat al imunosensorilor. Uneori, este dificil să se facă o distincție clară între imunosensori şi tehnici imunoanalitice care au la bază metode electrochimice, deoarece modurile de abordare şi tehnologia folosite sunt foarte apropiate sau identice. Tehnicile analizei omogene se bazează pe modificarea semnalului dat de marker în momentul în care conjugatul analit-marker formează imunocomplexul cu anticorpul (figura 6.6.). Datorită formării complexului, centrul activ al enzimei este ecranat (mascat) şi accesul către acesta al moleculelor de substrat este parțial sau complet blocat. Acest mod de determinare este foarte simplu, componenții reacției se amestecă cu proba iar răspunsul se măsoară de obicei cinetic. S-au descris astfel de tehnici având la bază clorperoxidază şi glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza.

Tipurile de determinări heterogene au fost studiate mai mult datorită limitelor lor de detecție mult mai bune pe care acestea le prezintă. De obicei, imunoanaliza convențională în fază solidă bazată pe enzima imobilizată (ELISA) se realizează pe micro-plăci, în tuburi, capilare sau plăci de sticlă. Reacția este urmărită prin intermediul unui de sensor electrochimic care poate detecta semnalul generat de markerul folosit; deci componenta imunochimică nu este în contact intim cu traductorul. Metoda presupune în continuare o serie de etape de spălare, de adiție a substratului şi de incubare după care în final se obține produsul de reacție care poate fi măsurat electrochimic prin intermediul unor sensorii chimici sau al unor biosensori.

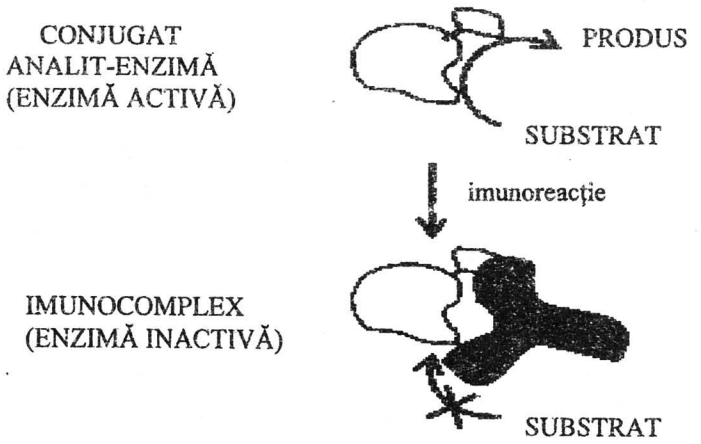


Fig. 6.6. Principiul imunoanalizei omogene.Prin cuplarea analitului de Ac specific rezultă inactivarea enzimei.

Markerii enzimatici au fost utilizați în cadrul imunodeterminărilor electrochimice, în tabelul 6.2. fiind redate o serie de exemple.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tab. 6.2. Exemple de markeri enzimatici folosiţi pentru imunodetecţia electrochimică [28].

ENZIMA	SUBSTRATUL	TRADUCTOR
Peroxidaza	H_2O_2 + iodura (ferocen, qinona) H_2O_2 transfer direct de electroni	Amperometric Potentiometric
Lacaza	O_2+ hidrochinona	Amperometric (O_2)
Catalaza	H_2O_2	Amperometric(O_2)
Glucoz-oxidaza	O_2 (ferocen + glucoza)	Amperometric
Alcalin-fosfataza	p-aminofenil fosfat	Amperometric
Galactozidaza	p-aminofenil β-D-galactozidaza	Amperometric
Ureaza	Urea	Potentiometric Conductometric
Acetil-colinesteraza	Acetilcolina	Amperometric

Afinitatea anticorpilor pentru analit este caracterizată de obicei cu ajutorul constantei cinetice de echilibru al asocierii K_A. Valori mari ale constantei K_A conduc la o sensibilitate mică a metodelor. În scopul regenerări suprafeţei sensibile a sensorului anticorpii trebui să prezinte anumite proprietăţi cinetice. Astfel, anticorpii cu constante cinetice ale vitezelor de disociere foarte scăzute ($k_d<10^{-4}$ s^{-1}), sunt adecvaţi sistemelor de unică folosinţă, suprafaţa sensorilor neputând fi regenerată prin disocierea imunocomplecşilor.

În cazul analizelor competitive, limita de detecţie poate fi îmbunătăţită prin folosirea analiţilor marcaţi la diluţii foarte mari, deoarece o cantitate mai mică de analit este suficientă pentru a satura situsurile de legare de pe suprafaţa sensibilă. Pe de altă parte, această abordare este limitată de faptul că semnalul generat de markerul legat trebuie să fie măsurat cu precizie. Pentru obţinerea unui semnal mărit, este necesară aplicarea unor scheme de amplificare pentru reciclarea produşilor eliberaţi în reacţia markerului enzimatic.În continuare se vor prezenta câteva exemple elocvente.

Alcalin-fosfataza (ALP) este folosită frecvent în imunoanalizele fotometrice şi amperometrice convenţionale. Substratul utilizat în reacţia enzimatică este 4-aminofenil fosfat (PAPP), acest compus putând fi uşor oxidat la un potenţial scăzut al electrodului (0,3V). În acest mod s-a determinat α-fetoproteina şi teofilina, în cadrul unei analize în flux.

Determinarea fosfatazei acide prostatice, necesită ALP cu $NADP^+$ drept cosubstrat. NAD^+, produs în urma hidrolizei este regenerat în urma reacţiei cu alcool-dehidrogenaza şi diaforaza, semnalul analitic fiind generat prin oxidarea amperometrică a ferocianurii.

6.10. IMUNOSENSORI

Imunosensorii se bazează pe intereacţia specifică dintre Ag:Ac, discutată mai sus. Analizele au la baza modele imunochimice heterogene. Conexiunile dintre elementele de biorecunoaştere şi electrozi sunt realizate prin diverse tehnici. Iniţial, erau tehnicile bazate pe membrane de biorecunoaştere, acestea fiind aplicate la construcţia biosensorilor. Câteva modele s-au bazat pe electrodul de oxigen Clark ce era pus în contact cu membrana ce continea anticorpii legati. Catalaza era folosită drept marcator ce cataliză eliberarea oxigenului, determinarea α-fetoproteinei folosind conjugarea ei cu catalaza fiind un bun exemplu. Mai convenabil a fost, mai apoi, legarea directă a moleculelor imunospecifice de suprafaţa sensibilă datorită ori adsorbţiei, ori legării covalente. A fost descrisă în literatură o metodă de analiză tip "sandwich" în care anticorpul primar era imobilizat pe particole de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

grafit dispersate, încât imunoreactorul astfel construit servea simultan şi ca electrod. Anticorpul secundar a fost marcat cu peroxidază. De obicei electrozii sunt folosiţi de mai multe ori şi numai membranele de biorecunoaştere sunt înlocuite. Sensorii obţinuti prin tehnica "screen printed" au servit la dezvoltarea imunosensorilor amperometrici pentru detecţia ierbicidului acid 2,4-diclorfenoxiacetic folosindu-se peroxidază drept marcator. Limita de detecţie obţinută a fost de 0,1μg/L, mai târziu obţinându-se o creştere substanţială de sensibilitate (9 ng/L, timp de analiza 30 min) folosind acetilcolinesterază cu activitate foarte mare ca marcator.

Electrozii potenţiometrici au fost aplicati la monitorizarea modificărilor supratensiunii de reacţie în cursul transferului electronic direct dintre electrod şi peroxidaza legată şi marcatorii pe bază de lacază. Conjugatul acetilcolinesterază-hCG a fost determinat cu un electrod de pH.

Un sistem bazat pe capacitatea electrică este cel folosind electrozi pe care s-a depus polimerul Eudragit S 100 care se dizolvă spontan în mediu bazic. Prin hidroliza enzimatică a ureei are loc o mărire a pH-ului. Această posibilitate a fost utilizată la determinarea IgG folosindu-se ambele tipuri de analize, competitivă şi necompetitivă; limita de detecţie fiind de 0,1 μg/L în ambele cazuri, obţinându-se o modificare a capacităţii electrice de peste două ordine de mărime. Un alt marker folosit în astfel de determinări este catalaza care descompune apa oxigenată cu producere de oxigen care poate conduce deasemenea la modificari ale capacităţii.Acest principiu este aplicat la construcţia CASIS (sistem instrumental pe baza de sensor capacitiv de afinitate), dispozitiv care este livrat comercial de firma Biotronic System.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOGRAFIE

1. A. L. Lehninger, *Biochemistry, the Molecular Basis of Cell Structure and Function*, Flammarion, Paris 1972.
2. A. Ciucu, *Teză de Doctorat*, Institutul Politehnic Bucureşti, Bucureşti 1986.
3. M. Mascini, G. Palleschi, *Selective Electrode Rev.*, 11 (1989) 191.
4. K. G. Scrimgeour, *Chemistry and Control of Enzyme Reactions*, Academic Press, New York 1977.
5. D. V. Roberts, *Enzyme Kinetics*, Cambridge University Press, Cambridge, London-New York-Melbourne 1977.
6. A. Cornish-Bowden, *Principles of Enzyme Kinetics*, Butterworths, London-Boston 1975.
7. A. Ciucu, V. Magearu, C. Luca, *Rev. roum. Biochim.*, 20 (1983) 105.
8. G. G. Guilbault, *Enzymatic Methods of Analysis*, Pergamon Press, Oxford 1970.
9. I. F. Dumitru, D. Iordăchescu, *Introducere în Enzimologie*, Edit. Medicală, Bucureşti 1981.
10. J. L. Marty, N. Mionetto, I. Karube, *Biosens. Bioelctron.*, 9 (1994) 463.
11. T. Noguer, A. Gradinaru, A. Ciucu, J. L. Marty, *Anal. Lett.*, 32 (1999) 1723.
12. C. Tran Minh, *Biosensors*, Chapman Hall, London 1993.
13. R. S. Sethi, *Biosens. Bioelectron.*, 9 (1994) 243.
14. A. Ciucu, R. P. Baldwin, *Electroanalysis*, 4 (1992) 515.
15. L. C. Clark, C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 102 (1962) 29.
16. V. Magearu, *Controlul Analitic al Proceselor Biotehnologice*, Edit. Tehnică, Bucureşti 1988.
17. S. J. Updike, G. P. Hicks, *Nature* (London), 214 (1967)986.
18. G. G. Guilbault, G. J. Montalvo, *J. Am. Chem. Soc.*, 91 (1969) 2164.
19. N. Gough, P. Carr, *Electroanalysis*, 6 (1992) 600.
20. I. Mell, J. Melloy, *Electroanalysis*, 8 (1992) 684.
21. A. Ciucu, V. Magearu, C. Luca, *Anal. Lett.*, 18 (1985)299.
22. F Munteanu, A. Lindgren, J. Emneus, L. Gorton, T. Ruzgas, A. Ciucu, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2596.
23. A. Lindgren, L. Stoica, T. Ruzgas, A. Ciucu,, L. Gorton, *The Analyst*, 124 (1999) 527.
24. A. Ciucu, V. Magearu, S. Fleschin, I. Lucaciu, F. David, *Anal. Lett.*, 24 (1990) 2005.
25. M. Mascini, G. Palleschi, *Anal. Chem.*, 69 (1979) 249.
26. G. E. Baiulescu, V. V. Coşofreţ, *Applications of Ion-Selective Membrane Electrodes in Organic Analysis*, Wiley Chichester 1977
27. A. Ciucu, V. Magearu, C. Luca, *Anal. Lett.*, 22 (1989) 2673.
28. A. Ciucu, *Biosensors for Environmental Monitoring*, Ed. Niculescu, Bucharest 2000.
29. A. Ciucu, G. L. Radu, *St. Cerc. Biochim.*, 31 (1988) 125.
30. V. Magearu, A. Ciucu, *Anal. Lett.*, 23 (1990) 2005.
31. S. A. Berson, R. S. Yallow, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 82 (1959) 338.
32. B. D. Hammock, R. O. Mummas, in *Recent Advances in Pesticide Analytical Methodology*, J. Harvey, G. Zweing, Ed., ACS, Washington D.C. 1980.
33. D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, *J. Electroanal. Chem.*, 402 (1996) 227.
34. D. J. O'Shannessy, M. Wilchek, *Anal. Biochem.*, 191 (1990) 1.
35. C. S. Lee, P. Y. Huang, D. M. Ayres, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 464.

VERIFICAT 2017
VERIFICAT 2007
BIBLIOTECA BUCUREŞTI
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ISBN: 973-575-415-0

Lei 25700

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro